

Aus der
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des
Universitätsklinikums Rostock

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Guido Hildebrandt

In-vitro-Untersuchungen zur Ermittlung der
kombinierten Wirkung von Panitumumab und
ionisierender Strahlung auf die Tumorzellen A549
und HT-29



Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Nina Tiemann
Rostock, 21.01.2011

Gutachter

1. Gutachter:
Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Rostock

2. Gutachter:
PD Dr. rer. nat. et med. habil. Kirsten Peters
Zentrum für Medizinische Forschung / Arbeitsbereich Zellbiologie, Universität Rostock

3. Gutachter:
Prof. Dr. med. Claus Rödel
Klinik für Strahlentherapie und Onkologie, Klinikum und Fachbereich Medizin der Johann
Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Datum der Einreichung: 21.01.2011

Datum der Verteidigung: 23.11.2011

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 TUMORERKRANKUNGEN	1
1.1.1 Molekulare Grundlagen der Tumorentstehung	2
1.1.2 Der Zellzyklus	2
1.2 BEHANDLUNG VON TUMORERKRANKUNGEN MITTELS RADIOTHERAPIE	3
1.2.1 Die Radiotherapie	3
1.2.2 Biologische Strahlenwirkung	4
1.3 CHEMOTHERAPIE MIT EINEM MONOKLONALEN ANTIKÖRPER	5
1.3.1 Angriff am Signalweg des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors	6
1.3.2 Panitumumab (Vectibix®)	7
1.3.3 KRAS als prädiktiver Faktor für eine selektive Therapie am EGFR	8
1.4 ZIELSTELLUNG	10
2 Material und Methoden	11
2.1 ZELLBIOLOGISCHE ARBEITSTECHNIKEN	11
2.1.1 Tumorzellen	11
2.1.2 Ausfrieren der Zellen	12
2.1.3 Zellkultivierung	12
2.1.4 Zellzahlbestimmung	13
2.1.5 Materialien und Geräte	13
2.2 WIRKSTOFFE	14
2.2.1 Panitumumab	14
2.2.2 Sorafenib	15
2.3 WACHSTUMSVERSUCHE	15
2.3.1 Allgemeine Durchführung	16
2.3.2 Wachstum unter Einfluss von Panitumumab	16
2.3.3 Wachstumskurven unter Einfluss von Sorafenib und Panitumumab	17
2.3.4 Materialien und Geräte	17
2.4 DIE BESTRAHLUNG MIT DEM LINEARBESCHLEUNIGER	17
2.5 METABOLISCHE AKTIVITÄT, XTT-TEST (EZ4U)	18
2.5.1 Metabolische Aktivität unter Einfluss von Panitumumab	18
2.5.2 Metabolische Aktivität unter Einfluss von Panitumumab und ionisierender Strahlung	18
2.5.3 Materialien und Geräte	19
2.6 INDIREKTER ZELLPROLIFERATIONSTEST, BRDU	19
2.6.1 BrdU- Einbau in Abhängigkeit von Panitumumab	19
2.6.2 BrdU-Einbau in Abhängigkeit von Panitumumab und ionisierender Strahlung	20
2.6.3 Materialien und Geräte	20
2.7 LDH- FREISETZUNG, ZYTOTOXIZITÄTSTEST	20
2.7.1 Allgemeiner Ablauf und Berechnung der Zytotoxizität	20
2.7.2 Materialien und Geräte	21
2.8 KOLONIEBILDUNGSTESTS	22
2.8.1 Allgemeine Durchführung	22
2.8.2 Materialien und Geräte	23
2.9 IMMUNFLUORESCENZ (IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNG)	23

2.9.1	Das Prinzip des γ -H2AX-Nachweises	23
2.9.2	Probenvorbereitung	23
2.9.3	Fluoreszenzmikroskopie	24
2.9.4	Materialien und Geräte	25
3	Ergebnisse	26
3.1	WACHSTUMSKURVEN	26
3.1.1	Wachstumskurven der A549-Zellen	26
3.1.1.1	Wachstum der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab- hoher Dosisbereich	26
3.1.1.2	Wachstum der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab- niedriger Dosisbereich	29
3.1.1.3	Wachstum der A549-Zellen unter dem Einfluss von Panitumumab und Sorafenib	31
3.1.2	Wachstumskurven der HT-29-Zellen	32
3.1.2.1	Wachstum der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab	32
3.1.2.2	Wachstum der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab und Sorafenib	33
3.2	METABOLISCHE AKTIVITÄT	35
3.2.1	Metabolische Aktivität unter Einfluss von Panitumumab	35
3.2.2	Metabolische Aktivität unter Einfluss von Panitumumab und Bestrahlung	36
3.3	UNTERSUCHUNG DER ZELLPROLIFERATION MITTELS BRDU-TEST	38
3.3.1	BrdU-Einlagerung unter Einfluss von Panitumumab	38
3.3.2	BrdU-Einlagerung unter Einfluss von Panitumumab und Bestrahlung	39
3.3.2.1	BrdU-Einbau in A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab und ionisierender Strahlung	39
3.3.2.2	BrdU-Einbau in den HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab und ionisierender Strahlung	42
3.4	LDH-FREISETZUNG - UNTERSUCHUNG DER ZYTOTOXIZITÄT VON PANITUMUMAB	45
3.5	KOLONIEBILDUNGSTESTS	47
3.5.1	Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab	47
3.5.2	Koloniebildungsfähigkeit der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab	51
3.6	NACHWEIS VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN MITTELS γ -H2AX-TEST	53
3.6.1	Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen in A549-Zellen	53
3.6.2	Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen in HT-29-Zellen	55
4	Diskussion	57
4.1	WACHSTUMSVERSUCHE	57
4.1.1	Natives Wachstum von A549-Zellen und HT-29-Zellen	57
4.1.2	Wachstum der A549-Zellen und HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab	57
4.1.3	Wachstum der A549-Zellen und HT-29-Zellen unter Einfluss von Sorafenib (BAY 43-9006)	59
4.2	METABOLISCHE AKTIVITÄT DER A549-ZELLEN UND HT-29-ZELLEN	60
4.2.1	Metabolische Aktivität unter Einfluss von Panitumumab	60
4.2.2	Metabolische Aktivität unter Einfluss von Panitumumab und Bestrahlung	61
4.3	UNTERSUCHUNG DER ZELLPROLIFERATION DER A549 UND DER HT-29-ZELLEN MITTELS BRDU-TEST	62
4.3.1	Zellproliferation unter Einfluss von Panitumumab	62
4.3.2	Zellproliferation unter Einfluss von Panitumumab und Bestrahlung	63
4.4	LDH-FREISETZUNG AUS DEN A549-ZELLEN UND HT-29-ZELLEN	64
4.5	KOLONIEBILDUNGSTESTS	65
4.5.1	Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab	65
4.5.2	Koloniebildungsfähigkeit der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab	67
4.6	BESTIMMUNG DER γ -H2AX-FOCI ALS MAß FÜR DIE REPARATURKAPAZITÄT VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN	68
5	Zusammenfassung	71

Literaturverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: EGR-Rezeptorbindung und die Aktivierung der Hauptsignalwege	7
Abb. 2: Mikroskopische Darstellung der HT-29-Zellen.....	11
Abb. 3: Mikroskopische Darstellung der A549-Zellen	11
Abb. 4: Wachstum der A549-Zellen in Abhängigkeit von 50 nM - 5 μ M Panitumumab.	27
Abb. 5: Zellpopulation der A549-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab und der Inkubationszeit....	28
Abb. 6: Wachstum der A549-Zellen in Abhängigkeit von 1 nM - 50 nM Panitumumab	29
Abb. 7: Zellpopulation der A549-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab und der Inkubationszeit....	30
Abb. 8: Wachstum der A549-Zellen in Abhängigkeit von 50 nM bzw. 100 nM Panitumumab und 4 μ M Sorafenib	31
Abb. 9: Wachstum der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von 50 nM - 5 μ M Panitumumab	32
Abb. 10: Wachstum der HT-29-Zellen mit 50 nM bzw. 100 nM Panitumumab und 4 μ M Sorafenib)	34
Abb. 11: Metabolische Aktivität von A549- Zellen und HT-29-Zellen bei Inkubation mit 50 bzw. 100 nM Panitumumab.....	35
Abb. 12: Metabolische Aktivität der A549-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab und Bestrahlung	36
Abb. 13: Metabolische Aktivität der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab und Bestrahlung	37
Abb. 14: BrdU-Einbau in die A549-Zellen in Abhängigkeit von einer 48-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab (50 nM - 500 nM).....	38
Abb. 15: BrdU-Einbau in die HT-29-Zellen in Abhängigkeit von einer 48-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab (50 nM - 500 nM).	39
Abb. 16: BrdU- Einbau in A549-Zellen in Abhängigkeit von einer 48-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab und 6 Gy Bestrahlung.....	40
Abb. 17: BrdU- Einbau in A549-Zellen in Abhängigkeit von einer 72-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab und 6 Gy Bestrahlung. BrdU-Zugabe vor Bestrahlung.....	41
Abb. 18: BrdU-Einbau in A549-Zellen in Abhängigkeit von einer 72-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab und 6 Gy Bestrahlung. BrdU-Zugabe nach Bestrahlung.....	42
Abb. 19: BrdU-Einbau in HT-29-Zellen in Abhängigkeit von einer 48-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab und 6 Gy Bestrahlung.....	43
Abb. 20: BrdU-Einbau in HT-29-Zellen in Abhängigkeit von einer 72-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab und 6 Gy Bestrahlung. BrdU-Zugabe vor Bestrahlung.....	43
Abb. 21: BrdU-Einbau in HT-29-Zellen in Abhängigkeit von einer 72-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab und 6 Gy Bestrahlung. BrdU-Zugabe nach Bestrahlung.....	44
Abb. 22: LDH-Freisetzung von A549-Zellen und HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab (100 nM bzw. 500 nM). Inkubationszeit mit Panitumumab 24 h.....	45

Abb. 23: LDH-Freisetzung von A549-Zellen und HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab (100 nM bzw. 500 nM). Inkubationszeit mit Panitumumab 48 h.....	46
Abb. 24: Zellüberleben der A549-Zellen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (0 Gy - 8 Gy) und Panitumumab 50 nM bzw. 100 nM. Versuchsdauer 14 Tage	48
Abb. 25: Zellüberleben der A549-Zellen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (0 Gy - 8 Gy) und Panitumumab 50 nM bzw. 100 nM. Versuchsdauer 12 Tage	50
Abb. 26: Zellüberleben der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (0 Gy - 8 Gy) und Panitumumab 50 nM	52
Abb. 27: „Foci“ in A549-Zellen nach der Bestrahlung mit 6 Gy und einer Reparaturzeit von 24 h	53
Abb. 28: Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in A549-Zellen in Abhängigkeit von 50 nM Panitumumab (PNT), 6 Gy Bestrahlung und 1 h bzw. 24 h Reparaturzeit	54
Abb. 29: Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in HT-29-Zellen in Abhängigkeit von 50 nM Panitumumab (PNT), 6 Gy Bestrahlung und 1 bzw. 24 h Reparaturzeit	55

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die für die verschiedenen Versuche angesetzten Verdünnungen von Panitumumab	15
Tab. 2: Darstellung der für den γ -H2AX-Test verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen	24
Tab. 3: Übersicht über die Anregungsfilter in der durchgeführten Fluoreszenzmikroskopie	24
Tab. 4: Zellpopulationsverdopplungszeit in Abhängigkeit vom Inkubationstag und der Panitumumab-Konzentration	28
Tab. 5: Zellpopulationsverdopplungszeiten der A549-Zellen in Abhängigkeit von 1 nM - 50 nM Panitumumab.....	30
Tab. 6: Zellpopulationsverdopplungszeiten der HT-29-Zellen in Abhängigkeit vom Inkubationstag und der Panitumumab-Konzentration.	33
Tab. 7: Plattiereffizienz der A549-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab (50 nM bzw. 100 nM) und verschiedener Bestrahlungsdosen (0 Gy - 8 Gy).	47
Tab. 8: Plattiereffizienz der A549-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab (50 bzw. 100 nM) und verschiedener Bestrahlungsdosen (0 Gy - 8 Gy).	49
Tab. 9: Plattiereffizienz der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von 50 nM Panitumumab und verschiedener Bestrahlungsdosen (0 Gy - 8 Gy).	51

Abkürzungsverzeichnis

ABX-EGF	Panitumumab
BrdU	5-bromo-2-desoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin (Rinder Serum Albumin)
BSC	Best supportive care
C225	Cetuximab
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetylsuloxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor (Epidermaler Wachstumsrezeptor)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency (Europäische Arzneimittelagentur)
et al.	und andere
FBS	Fetal Bovine Serum (fetales Rinderserum)
G0/1/2-Phase	Gap (Lücke)-Phase (Wachstumsphase im Zellzyklus)
GDP	Guanosin-di-phosphat
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosin-tri-phosphat
Gy	Gray
H2AX	Phosphoryliertes der Histongruppe H2A
HAMA	Humane anti-mouse Antikörper
HER	Human epidermal receptor
IgG	Immunglobulin der Gruppe G
LDH	Laktatdehydrogenase
LET	Linearer Energietransfer

MAPK	Mitogenaktivierende Proteinkinase
mCRC	Metastasiertes kolorektales Karzinom
MeV	Megaelektronenvolt
M-Phase	Mitose-Phase (Zellzyklus)
MW	Mittelwert
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer (Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom)
OS	Overall survival (Gesamtüberleben)
p53	(Tumor)protein 53
PBS	Phosphate buffered Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
PFS	Progression free survival (Progressionsfreies Überleben)
PIP3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PNT	Panitumumab
pRb	Retinoblastom-Protein
PTEN	Phosphatase and tensin homolog (Enzym)
Raf	Serin/Threonin-Kinase im MAPK-Signalweg von Tyrosinkinasen
Ras	Kleines monomeres guaninnucleotid-bindendes Protein
rpm	Revolutions per minute (Umdrehung pro Minute)
SCLC	Small Cell Lung Cancer (Kleinzelliges Bronchialkarzinom)
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
S-Phase	Synthese-Phase (Zellzyklus)
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF	Transforming growth factor (Transformierender Wachstumsfaktor)
TKI	Tyrosinkinaseinhibitoren
XTT	Natrium-3,3'-(1-phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium-bis-(4methoxy- 6-nitro)benzensusphonsäure)
λ	Lambda

1 Einleitung

1.1 Tumorerkrankungen

Maligne Tumoren haben in den letzten Jahrzehnten ständig an Häufigkeit zugenommen und sind in der Bundesrepublik Deutschland die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Grund dafür ist die zunehmende Lebenserwartung und die damit verbundene größere Wahrscheinlichkeit an einem Tumor zu erkranken, als auch der medizinische Fortschritt mit besseren Therapieoptionen, z.B. bei der Behandlung von Infektionskrankheiten. Zusätzlich hat die Inzidenz (Neuerkrankungsrate) einiger Tumore durch Umweltfaktoren oder verschiedene Lebensstile (u. a. Rauchen, schlechte Ernährung) zugenommen (SAUER, 2010).

Das Charakteristische von Malignomen ist ihr invasives und destruktives Wachstum in das umgebende Gewebe. Sie respektieren keine Organgrenzen und haben die Fähigkeit hämatogenen oder lymphogenen zu metastasieren (HENNE-BRUNS *et al.*, 2003). Zytologische Merkmale maligner Tumoren sind erhöhte Mitoseraten, stark wachsende Zellkerngrößen (Kernpolymorphie) und wechselnde Zellformen (Zellpolymorphie). Ursachen für die Tumorentstehung sind vielfältig und können auf exogenen Faktoren bzw. Karzinogenen wie z.B. Strahlung oder Tabakrauch beruhen sowie durch endogene Faktoren wie z.B. Mutationen im Reparatursystem verursacht werden.

Die höchste Inzidenz besitzt das Prostatakarzinom beim Mann und das Mammakarzinom bei der Frau. Bei beiden Geschlechtern ist das Kolorektale Karzinom die Erkrankung mit der zweithöchsten Inzidenz, während das Bronchialkarzinom die dritte Position einnimmt (ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2010). Das Kolorektale Karzinom tritt in 90% der Fälle nach dem 50. Lebensjahr auf. Bei der Ätiologie spielen genetische Aspekte, Risikoerkrankungen wie die Colitis ulcerosa und Ernährungsfaktoren eine Rolle. Das Bronchialkarzinom ist die häufigste Krebstodesursache beim Mann. Unterschieden werden Kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC), die aufgrund ihrer frühen Metastasierungstendenz eine schlechte Prognose haben, von den häufiger vorkommenden Nicht-Kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC). Die NSCLC lassen sich desweiteren in Plattenepithel-, Adeno- und Großzelliges Bronchialkarzinom differenzieren. Mit Ausnahme des Adenokarzinoms sind 85% der Bronchialkarzinome auf die Inhalation von Zigarettenrauch zurückzuführen (HEROLD, 2009). Mechanismen der Tumorentstehung werden im kommenden Abschnitt 1.1.1 einführend erläutert.

1.1.1 Molekulare Grundlagen der Tumorentstehung

Onkogene und Antionkogene sind Gene, die in großer Anzahl in Tumorgeweben vorkommen. Die Aminosäuresequenz der zugehörigen Onkogen- und Antionkogenproteine zeigt eine große Strukturähnlichkeit mit den an der Wachstumsregulation beteiligten Faktoren. Dies führte zu der Annahme, dass Onkogene aus den Genen entstanden sind, die für die normale Zellproliferation gesunder Zellen nötig sind (LÖFFLER *et al.*, 2007). Für die Wachstumsregulation von gesunden Zellen sind zwei verschiedene Gentypen von entscheidender Bedeutung: die Protoonkogene und die Tumor-Suppressorgene. Onkogene können dabei mutierte Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren oder Bestandteile der intrazellulären Signaltransduktion der Wachstumsfaktoren sein. In jedem Fall ist es von enormer Bedeutung, dass sie zur permanenten Aktivierung der zur Proliferation benötigten Signalwege führen. Ein Beispiel stellt das *RAS-Onkogen* dar, bei dem es sich um ein mutiertes G-Protein handelt. Mutierte Tumor-Suppressorgene werden hingegen als Antionkogene bezeichnet. In normalen Zellen führt die Schädigung der DNA, hervorgerufen durch verschiedenste Noxen, zum Stillstand der Zellproliferation und häufig zum Absterben der Zellen durch Apoptose, wenn die zellulären DNA-Reparatursysteme nicht zur Beseitigung des Defekts befähigt sind. Die Tumorsuppressorgene *pRb* und *p53* verhindern den Übergang der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus und fördern die Apoptose als Antwort auf eine DNA-Schädigung. Das *pRb*-Gen ist in mehr als 60% und *p53*-Gen bei über der Hälfte aller menschlichen Tumoren zur Funktionsunfähigkeit mutiert. Dadurch entfallen wichtige Kontrollpunkte im Zellzyklus, was mit einer verminderten Apoptoserate und einer erhöhten Proliferationsrate der Zellen einhergeht und im folgenden Abschnitt genauer erläutert werden soll.

1.1.2 Der Zellzyklus

Der Lebenszyklus aller eukaryotischen Zellen beginnt und endet mit einer Zellteilung. Die Teilung der Zelle wird als M-Phase (Mitose-Phase) bezeichnet und wird in die eigentliche Spaltung des Zellkerns (Mitose) und die Halbierung der Zelle (Cytokinese) untergliedert (ALBERTS *et al.*, 1999). Die Zeit zwischen zwei M-Phasen wird als Interphase bezeichnet. Sie nimmt den größten zeitlichen Anteil am Zellzyklus ein und ist durch die Transkription von Genen, die Synthese von Proteinen und die Massenzunahme charakterisiert. Die Interphase setzt sich aus drei verbleibenden Zellzyklusphasen zusammen. Nach der M-Phase treten die proliferierenden Zellen in die G₁-Phase (engl. *gap*) ein, in der die Zellen wachsen und Zeit haben ihre zytoplasmatischen Organellen zu verdoppeln. Als Antwort auf noch unbekannte Signale, die

häufig mit terminaler Differenzierung einhergehen, können die Zellen von der G_1 - in die G_0 -Phase übergehen, in der sie sich über lange Zeiträume aufhalten können (LÖFFLER *et al.*, 2007). Unter Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren treten die Zellen in die Synthesephase (S-Phase) ein, in der die Zellen ihre Kern-DNA als wichtige Voraussetzung für die Zellteilung replizieren. Nach der S-Phase folgt die G_2 -Phase, die häufig relativ kurz ist und am Ende mit der Kondensation der Chromosomen den Eintritt in die M-Phase signalisiert. In der Mitose erfolgt die gleichmäßige Verteilung der replizierten Chromosomen auf die Tochterzellen.

Das Verbleiben von Zellen im zur Proliferation führenden Zellzyklus hängt von der Anwesenheit verschiedener Wachstumsfaktoren ab. Diese haben gemeinsam, dass sie über Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität interagieren und so die Transkription von zellzyklusfördernden Genen (wie z. B. Cyclinen) induzieren.

1.2 Behandlung von Tumorerkrankungen mittels Radiotherapie

In Abhängigkeit von der Histologie, der Lokalisation und der Ausdehnung einer malignen Neoplasie und der zusätzlichen Berücksichtigung des Allgemeinzustandes eines Patienten wird zwischen einer Behandlung mit kurativer und palliativer Zielsetzung unterschieden. Die Kurativtherapie ist auf Heilung ausgerichtet, sofern nach prätherapeutischer Diagnostik eine realistische Heilungschance besteht. Die Palliativbehandlung hingegen bezweckt die Linderung oder Prophylaxe tumorbedingter Symptome. Das Behandlungskonzept von Tumoren umfasst Operation, Strahlentherapie und Chemo- bzw. Hormontherapie. In Anbetracht der Art des Tumors, dessen Ausbreitung und des Malignitätsgrades, wird entweder eine Methode bevorzugt oder eine geeignete Kombination aus mehreren Behandlungsformen gewählt.

1.2.1 Die Radiotherapie

Wenn es sich um einen strahlenempfindlichen Tumor handelt und ein besseres funktionelles und kosmetisches Ergebnis zu erwarten ist, wird die alleinige Strahlentherapie der Operation vorgezogen. Häufig wird die Radiotherapie auch präoperativ angewandt, um die vollständige Resektion zu erleichtern, ein Lokalrezidiv zu vermeiden und die Gefahr einer intraoperativen Tumorzellverschleppung zu vermindern. Können während einer Operation nicht alle Tumorteile entfernt werden, besteht ebenfalls die Möglichkeit einer postoperativen Bestrahlung. Die konsolidierende Radiotherapie zeichnet sich durch eine primär systemische Chemotherapie mit einer umschrieben eingesetzten Strahlentherapie aus. Bei dem Einsatz der Strahlentherapie ist die Möglichkeit der Wirkungsverstärkung von großem klinischen Interesse.

Dazu zählen z. B. die Fraktionierung unter Erhöhung von Einzeldosen (Akzeleration), die Sensibilisierung für ionisierende Strahlung durch Hyperthermie (40-41,5°C) und die Interaktion mit Chemotherapeutika. Bei der Interaktion mit Chemotherapeutika wird zwischen einem subadditiven, additiven und supraadditiven Effekt unterschieden. Beim subadditiven Effekt ist die Gesamtwirkung geringer als die Einzelwirkungen, während der additive Effekt die Addition der unabhängigen Einzelwirkungen darstellt. Der supraadditive Effekt beschreibt eine Sensibilisierung, bei der die Gesamtwirkung mehrerer Verfahren größer ist als die Einzelwirkungen. Die Potenzierung der Wirkung kann z. B. durch das Abtöten von strahlenresistenten Tumorzellklonen entstehen oder durch eine eingeschränkte Reparatur der strahleninduzierten DNA-Schäden hervorgerufen werden (SAUER, 2010).

Bei der kombinierten Behandlung mit einem Chemotherapeutikum und Bestrahlung kann in der Folge ein systemischer oder ein lokaler Effekt dominieren. Die simultane Radiochemotherapie zeichnet sich durch eine starke Lokalwirkung der Radiotherapie und einer systemischen Wirkung durch die Chemotherapie aus. Hierbei ist es von Bedeutung, dass sich die Effekte der Radio- und Chemotherapie nur im Tumorgewebe addieren, während sich die Nebenwirkungsspektren im Normalgewebe möglichst nicht überschneiden. Das Prinzip der neoadjuvanten Chemotherapie beruht meist auf einer gesteigerten Vulnerabilität des Tumorgewebes gegenüber der Bestrahlung.

1.2.2 Biologische Strahlenwirkung

Mittels Linearbeschleuniger wird in der Strahlentherapie ionisierende Photonenstrahlung erzeugt, die durch das Abbremsen beschleunigter Elektronen im Coulomb'schen Feld in der Atomhülle entsteht. Bei der Durchstrahlung von Materie wird die Strahlungsenergie auf Atome und Moleküle übertragen und resultiert in biologischen Effekten, wobei die DNA bisher als kritischstes Ziel angesehen wurde (HALL, 1994). Man unterscheidet die direkte Strahlenwirkung, bei der die Energieabsorption und die biologische Wirkung direkt im kritischen Ziel hervorgerufen werden, von der indirekten Strahlenwirkung, bei der die Strahlenenergie zunächst auf andere Zielmoleküle bzw. Atome abgegeben wird. Nach der Ionisation von Wasser entstehen Wasserradikale, die eine weitere Radikalkaskade aktivieren und schließlich zur indirekten Schädigung des kritischen Ziels führen. Die direkte Strahlenwirkung ist bei Strahlung mit hohem linearen Energietransfer (LET) z. B. schweren Ionen, Neutronen und α -Teilchen vorherrschend. Bei der Photonenstrahlung (niedriger LET) entstehen biologische Effekte zu zwei Dritteln über indirekte Strahlenwirkung. Ionisationspunkte liegen bei Strahlung mit hohem LET deutlich dichter, wodurch mehrere Schadensereignisse zusammentreffen und ein größerer Schaden

hervorgerufen werden kann. Daher wird der Hoch-LET-Strahlung auch eine höhere relative biologische Wirksamkeit zugeschrieben.

Ionisierende Strahlung verursacht an der DNA Brüche von Wasserstoffbrücken, Basenschäden, Strangbrüche, DNA-Vernetzungen und Mehrfachereignisse (sog. bulky lesions). Bei den DNA-Strangbrüchen wird zwischen Einzel- und Doppelstrangbrüchen unterschieden, die in ihrer Anzahl proportional zur Dosis zunehmen (SAUER, 2010). Die meisten Schäden können mittels eines komplexen Reparatursystems innerhalb von 6–8 h repariert werden. Ist der Schaden nicht reparabel, droht der Zelltod, der bei differenzierten Zellen durch einen Funktionsverlust gekennzeichnet ist. Bei proliferierenden Zellen charakterisiert der Zelltod den Verlust der reproduktiven Kapazität. In beiden Fällen folgt der programmierte Zelltod (Apoptose).

Die Strahlensensibilität von Zellen ist abhängig vom Zellzyklus. In der M-Phase und der G₂-Phase sind die Zellen am empfindlichsten. In der S-Phase sind die Zellen hingegen am strahlenresistentesten. Bei einer langen G₁-Phase sind die Zellen zunächst erneut resistent und werden zunehmend strahlensensibler (HALL, 1994). Zusätzlich sind alle Gewebe in Gegenwart von Sauerstoff deutlich strahlenempfindlicher als in Anoxie, da nur in dessen Anwesenheit Radikale gebildet werden können, die für die indirekte Strahlenwirkung verantwortlich sind. Zur Behandlung von Tumoren in anoxischen Bereichen werden zwei- bis dreifach höhere Strahlendosen benötigt. Beim Einsatz von dicht ionisierender Strahlung (Hoch-LET) ist sowohl der Sauerstoffeffekt, als auch die unterschiedliche Strahlenwirkung in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase weniger stark ausgeprägt.

1.3 Chemotherapie mit einem monoklonalen Antikörper

Chemotherapie im weitesten Sinne stellt eine Tumorbehandlung dar, die den ganzen Körper erfasst. Dabei kann es sich unter anderem um zytostatische oder zytotoxische Pharmaka, Hormone oder Substanzen zur Immuntherapie handeln. Die Chemotherapie kann aufgrund der Zugänglichkeit und des Nebenwirkungsspektrums auch an die Stelle von Operation oder Strahlentherapie treten. Zytostatika verhindern die Zellproliferation, so dass die Tumorzellzahl auf eine Größe reduziert wird, die vom Immunsystem beseitigt werden kann (SAUER, 2010). Es ist von Bedeutung, dass das Zytostatikum das Tumorgewebe in ausreichender Konzentration erreicht. Der Tumor wird nun stufenweise verkleinert, da kontinuierlich ein bestimmter Prozentsatz der ursprünglichen Zellzahl zerstört wird. Von einer Vollremission wird gesprochen, wenn die Zellzahl unter die Nachweisgrenze von 10^6 Zellen sinkt. Meist werden mehrere

Zytostatika kombiniert, um über verschiedene Wirkmechanismen und Zielstrukturen anzugreifen und um Resistenzen zu vermeiden.

1.3.1 Angriff am Signalweg des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors

In der Onkologie wird permanent nach neuen Substanzen gesucht, die die Prognose von Patienten mit soliden Tumoren verbessern. Aufgrund der mangelnden Differenzierung zwischen Tumor- und Normalgewebszellen beim Einsatz von traditionellen Zytostatika besteht ein unspezifisches zytotoxisches Potential zur Schädigung des gesunden Gewebes. Eine geringe zytotoxische Toleranz kann in einer subtherapeutischen Dosierung oder in einem frühzeitigen Therapieabbruch resultieren, was mit einer schlechten Prognose für den Patienten verbunden ist (HERBST & SHIN, 2001). Dies spiegelt das Streben nach einer zielgerichteten Therapie wider, die zwischen malignen und nicht-malignen Zellen unterscheidet, um so eine hohe therapeutische Effizienz bei gleichzeitig minimaler Zytotoxizität zu erreichen. Auch die Kombination mit der konventionellen Chemotherapie und/oder der Radiotherapie könnte bei einer zielgerichteten Therapie mit einem geringen Nebenwirkungsspektrum einen Benefiz zeigen. Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (*engl.* epidermal growth factor receptor, EGFR), der eine entscheidende Rolle im Tumorwachstum- und überleben spielt, stellt ein solch selektives Ziel für die zytostatische Therapie dar (BASÉLGA, 2002).

Der EGFR, auch als HER1 (human epidermal growth factor receptor 1) bezeichnet, gehört zur erbB Rezeptor-Familie, die aus vier ähnlich konstituierten Tyrosinkinasurezeptoren besteht. Diese Rezeptoren sind transmembrane Glykoproteine, die typischerweise aus einer extrazellulären liganden-bindenden Domäne, einer transmembranen Domäne und eine intrazelluläre Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität für die Signaltransduktion bestehen. Die Aktivierung des EGFR erfolgt über die Bindung eines Liganden wie z. B. der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der transformierende Wachstumsfaktor- α (TGF- α) oder des Amphiregulins an der extrazellulären Domäne. Daraufhin folgt die Dimerisierung zweier EGFR Monomere, die Autoaktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase, die Aktivierung einer Vielzahl von Effektorproteinen mittels Phosphorylierung und die damit verbundene Mündung in verschiedene Signalwege (GERBER, 2008). Die drei wichtigsten Signalkaskaden sind in der Abb. 1 dargestellt. Dazu gehört der Ras-Raf-MEK- oder MAP-Kinase- (mitogenaktivierende Proteinkinase) Signalweg, die STAT- (signal transducer and activator of transkription) und die PI3-K-Signalaskade (Phosphatidylinositol-3-Kinase) (JANMAAT & GIACCONE, 2003).

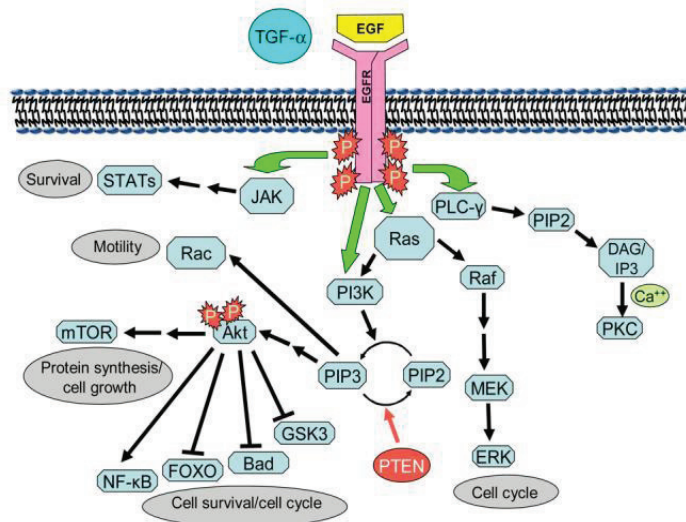


Abb. 1: EGR-Rezeptorbindung und die Aktivierung der Hauptsignalwege (DUTTA & MAITY, 2007)

Alle drei Wege resultieren in Mechanismen, die ein malignes Geschehen fördern: gesteigerte Zellproliferation, größeres Zellüberleben durch Apoptoseresistenz, Angiogenese und Metastasierung. Zusätzlich kann der EGFR-Komplex internalisiert werden und in den Zellkern translozieren, wo er die Transkription von Genen und DNA-Reparaturmechanismen moduliert.

EGFR ist in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert, was zu einer Überaktivierung der einzelnen Signalwege führt und in einer erhöhten Wachstumspotenz der Tumorzellen resultiert. In 80% der kolorektalen Tumoren soll diese Überexpression entscheidend für eine schlechte Patientenprognose sein (CHUA & CUNNINGHAM, 2006).

Zur selektiven Antitumorthherapie wurden deshalb Substanzen entwickelt, die auf verschiedene Weise am EGFR angreifen. Monoklonale Antikörper (mAb) wie Cetuximab und Panitumumab agieren an der extrazellulären Domäne des Rezeptors als Antagonisten. Die Hemmung der Tyrosinkinase an der intrazellulären Domäne kann mittels niedrig-molekularer Tyrosinkinaseinhibitoren (EGFR-TKIs) wie Erlotinib und Gefitinib erfolgen, die klinisch am besten untersucht sind. Andere weniger populäre Ansätze beziehen sich auf die Manipulation des Liganden und der fehlerhaften Synthese des EGFR.

1.3.2 Panitumumab (Vectibix®)

Panitumumab (ursprünglich ABX-EGF) ist der erste vollständige humane monoklonale Antikörper, der kompetitiv den EGFR hemmt. Es ist ein Antikörper der Klasse IgG2, der mittels XenoMouse™-Technologie entwickelt wurde, für deren Synthese Gene von menschlichen Immunglobulinen in die von Mäusen eingefügt werden. Die Stimulation zur Synthese von Immunglobulinen erfolgt über die intraperitoneale oder subkutane Beimpfung mit A431-Zellen, die in hoher Anzahl EGFR exprimieren (CARTENI *et al.*, 2007). Durch den voll humanen Aufbau,

besitzt Panitumumab im Gegensatz zu seinen chimären oder humanisierten Vorgängern (Cetuximab, Bevacizumab) theoretisch kein immunogenes Potential. Immunreaktionen sind selten und auch die Bildung humaner Antikörper gegen die murinen Proteine des EGFR-Antikörpers (HAMA) mit einem verbundenen Wirkungsverlust bleibt aus (YAN *et al.*, 2008).

Panitumumab bindet an den EGFR mit einer sehr hohen Affinität und verhindert die EGF-abhängige Tumorzellaktivierung- und proliferation. CARTENI *et al.* beschreiben weiter, dass über die EGFR-Blockierung mit Panitumumab das Wachstum verschiedener solider Tumoren begrenzt werden konnte. Die Wirkung war unabhängig von der EGFR-Expriemierung des karzinogenen Gewebes.

Bei der Therapie mit Panitumumab ist die Prämedikation wie z. B. mit Antihistaminika genauso wenig nötig wie die Aufsättigung. In klinischen Studien der Phasen I-III wurde die Therapie gut toleriert und ein akneähnliches Exanthem als häufigste Nebenwirkung beobachtet (GRIDELLI *et al.*, 2009). Dieses befindet sich meist im Kopf- und Brustbereich, hat seine stärkste Intensität in der vierten Woche nach Therapiebeginn und soll durch die EGFR-Inhibition von Hautzellen hervorgerufen werden (GARCIA-SAENZ *et al.*, 2009). Es wird eine Dosisabhängigkeit des Exanthems, aber keine Dosislimitierung beschrieben. Zusätzlich wird angenommen, dass Auftreten und Ausmaß des Exanthems mit einem besseren Therapieansprechen und einem größeren Überleben korrelieren (COHENURAM & SAIF, 2007; BIANCHINI *et al.*, 2008). Andere sehr häufige Nebenwirkungen sind Asthenie, Diarrhö und Hypomagnesämie, wovon keine dosislimitierend ist. Des Weiteren ist keine Interaktion mit anderen Chemotherapeutika bekannt, weder im Hinblick auf die Pharmakokinetik noch aufgrund der Toxizität. Die Kombination von Panitumumab mit anderen Chemotherapeutika oder der Radiotherapie wird daher als verträglich und angesichts additiver Effekte als effektiv eingeschätzt. 2007 wurde Panitumumab in Form der Monotherapie zur Behandlung des EGFR-positiven metastasierten kolorektalen Karzinoms (*KRAS*-Wildtyp) nach Versagen der Standardtherapie mit Fluoropyrimidin, Oxaliplatin und Irinotectan zugelassen. Dem wurde stattgegeben nachdem ein klarer Vorteil der Therapie mit Panitumumab gegenüber „best supportive care“ (BSC) gesichert werden konnte. Das PFS „progression free survival“ konnte durch Panitumumab signifikant verlängert werden (VAN CUSTEM *et al.*, 2007).

1.3.3 *KRAS* als prädiktiver Faktor für eine selektive Therapie am EGFR

KRAS ist ein G-Protein, das eine Schlüsselfunktion in der MAPK-Signalkaskade nach Aktivierung des EGFR besitzt. Es weist eine intrinsische GTPase-Aktivität auf, die normalerweise zur Inaktivierung des *RAS*-Proteins führt. Eine Mutation im Codon 12, 13 oder 61

des *KRAS*-Onkogens resultiert in einem Verlust der GTPase-Aktivität. Dies führt zu einer Dauerstimulation des Signalweges und der Unabhängigkeit gegenüber einer blockierenden Therapie am EGFR (GARCIA-SAENZ *et al.*, 2009). Diese Mutation soll in 40% der kolorektalen Karzinome vorhanden sein und hat zudem ein häufiges Vorkommen in Tumoren des Pankreas und der Lunge (FRIDAY & ADJEI, 2005).

In einem größeren klinischen Kollektiv konnte die Annahme der Therapieresistenz in Abhängigkeit vom *KRAS*-Status untermauert werden. In einer Phase-III-Studie bei therapieresistenten mCRC betrug die Ansprechrate auf eine Monotherapie mit Panitumumab 17% beim *KRAS*-Wildtyp, während Patienten mit einer *KRAS*-Mutation kein Therapieansprechen zeigten. Zudem wurde das mediane PFS beim Patienten mit *KRAS*-Wildtyp auf 12,3 Wochen im Vergleich zu 7,3 Wochen beim Mutationsträger verlängert (AMADO *et al.*, 2008). Aufgrund dieser Datenlage und ähnlicher Fallzahlen in Patientenkollektiven mit Cetuximab hat die Europäische Zulassungsbehörde (EMA) Panitumumab ausschließlich zur Therapie von *KRAS*-Wildtyp-Karzinomen zugelassen (DIETEL *et al.*, 2008). Dem Patienten bleiben so mögliche Nebenwirkungen erspart und unnötige Behandlungskosten können vermieden werden. Dafür ist die Untersuchung der Tumoren auf den *KRAS*-Status erforderlich (FAKIH, 2010). Durch ihre diskrete Anzahl, ihre Stabilität und der Nachweisbarkeit gelten *KRAS*-Mutationen als geeignete pharmakodiagnostische Marker (JIMENO *et al.*, 2009). Die Testung erfolgt laut DIETEL am archivierten formalinfixierten Paraffinmaterial mittels konventionellen Sequenzierungen oder Kit-basierter Testmethoden, die auf quantitativer PCR-Technik beruhen. Dennoch ist zu beachten, dass auch *KRAS*-Wildtyp Karzinome nicht immer auf eine Anti-EGFR-Therapie ansprechen. Dies ist in 40% der mCRC zu beobachten und lässt darauf schließen, dass auch andere Biomarker und Signalwege Einfluss auf die Ansprechrate einer Anti-EGFR-Therapie haben (CHUA *et al.*, 2010). Diese Marker beinhalten EGFR-Liganden, EGFR-Status, den RAS/RAF/MAPK- und den PTEN/PI3K/Akt-Signalweg.

1.4 Zielstellung

Bisher ist Panitumumab lediglich in der Monotherapie zur Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms zugelassen. Aufgrund der geringen toxischen Wirkungen und möglicher strahlensensibilisierender Effekte erscheint eine kombinierte Anwendung von Panitumumab und ionisierender Strahlung als vielversprechend.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, mittels vorklinischer *In-vitro*-Studien die kombinierte Wirkung von Panitumumab und ionisierender Bestrahlung auf die beiden humanen Tumorzelllinien HT-29 und A549 zu untersuchen. Anhand dieser Experimente wurden erste Aussagen zur klinischen Relevanz einer Kombinationstherapie erwartet.

Verschiedene *In-vitro*-Methoden wurden zudem angewandt, um das Wirkspektrum dieses ersten voll humanisierten Antikörpers auf die beiden Tumorzelllinien genauer zu charakterisieren. Ein besonderes Augenmerk galt dabei dem Vergleich der Wirkung des Antikörpers auf Zellen mit unterschiedlichem *KRAS*-Status (HT-29: *KRAS*-Wildtyp, A549: *KRAS*-Mutation), der laut klinischen Studien entscheidend für das Ansprechen auf Panitumumab ist.

2 Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Arbeitstechniken

2.1.1 Tumorzellen

Für die Experimente dieser Arbeit wurden die zwei humanen Tumorzelllinien A549 und HT-29 verwendet, die aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig stammen. Bei der Zelllinie HT-29 (siehe Abb. 2) handelt es sich um Zellen aus dem Epithel eines Adenokarzinoms des Kolons, wohingegen die A549-Zellen (siehe Abb. 3) aus einem Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom isoliert wurden. Beide Zelllinien sind kontinuierlich adhärent wachsend. Bei längerer Kultivierung ist durch die mangelnde Kontaktinhibition bei Tumorzellen auch das Wachstum als Multilayer möglich. Eine vollständige Konfluenz wurde deshalb bei der Kultivierung und bei der Auswahl der Zellen für experimentelle Ansätze vermieden.

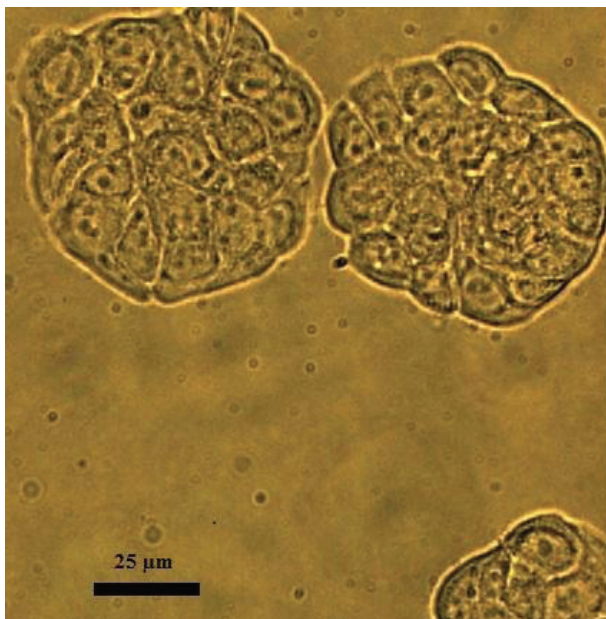


Abb. 2: Mikroskopische Darstellung der HT-29-Zellen



Abb. 3: Mikroskopische Darstellung der A549-Zellen

HT-29-Zellen (Abb. 2) und A549-Zellen (Abb. 3) subkultiviert in T₂₅-Kulturflaschen. 400x-Vergrößerung mit einem Phasenkontrastmikroskop. Kulturmedium entfernt, mit 3 ml PBS befeuchtet.

2.1.2 Ausfrieren der Zellen

Die Lieferung und Lagerung der Zellen erfolgte in einem Kryomedium bei -152°C in einer Kühltruhe, in dem die Zellen in 10% DMSO, 20% FBS und 70% Medium vorlagen. Das membrandurchlässige DMSO verhinderte die Kristallbildung des Mediums und schützte somit die Zellen.

Die im Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad zügig bei 37°C erwärmt, in ein Falconröhrchen überführt und langsam mit angewärmtem FBS-haltigem Kulturmedium verdünnt. Bei den A549-Zellen wurden 6 ml Medium tropfenweise dazu gegeben und die Suspension dann auf drei T₂₅-Zellkulturflaschen mit 5ml Medium verteilt. Es folgte die Inkubation für 24 h im Begasungsbrutschrank bei 5% CO₂ und 37°C bevor ein Mediumwechsel durchgeführt wurde, um tote Zellen und den Rest DMSO zu entfernen.

Die HT-29-Zellen wurden zusätzlich zentrifugiert. Der DMSO-enthaltene Überstand, der durch das Zentrifugieren bei 1250 rpm über 5 min entstand, wurde verworfen und die Zellen in 10 ml frischem FBS-haltigen Kulturmedium gelöst. Es folgte die Einsaat in zwei 25 cm² große Zellkulturflaschen. Die Inkubation und der Mediumwechsel waren identisch zu dem der A549-Zellen.

2.1.3 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung der Tumorzellen A549 und HT-29 fand in DMEM mit 10% FBS sowie 1% Penicillin/Streptomycin statt.

Für die Subkultivierung der Tumorzellen wurden die Zellkonzentrationen von 1×10^6 , $0,5 \times 10^6$, $0,25 \times 10^6$ und $0,125 \times 10^6$ Zellen/25 cm² Kulturflaschen gewählt. Der Zeitpunkt bis zum nächsten Passagieren war somit abhängig von der Zelldichte.

Vor dem Splitten wurde sowohl das Medium, das PBS, als auch das 0,05% Trypsin/EDTA kurz im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Um Zelldetritus und tote Zellen aus der Kultur zu entfernen, wurde der Zellrasen zweimal mit 5 ml PBS gespült, bevor 2 ml 0,05% Trypsin/EDTA hinzugegeben wurden und die Inkubation für 5 min im Begasungsbrutschrank erfolgte. Trypsin ist eine Protease des Verdauungstraktes, die durch Abbau der Zell-Zell-Kontakte den Zellverband auflöst und die Zellen vereinzelt. Zusätzlich werden auch die Zell-Matrix-Kontakte zwischen den Zellen und dem Flaschenboden gelöst. Diese beiden Prozesse werden vom EDTA unterstützt, indem zweiwertige Kationen wie Ca²⁺ komplexiert werden, Adhäsionsmoleküle reversibel gehemmt und Membranproteine stabilisiert werden.

Das erfolgreiche Ablösen der Zellen nach der Inkubation mit Trypsin/EDTA wurde mit Hilfe des Lichtmikroskops überprüft und anschließend die Reaktion mit 8 ml FBS-haltigem Medium gestoppt. Zusätzlich wurden die Zellen mit Hilfe der Pipette durchmischt und Zellklumpen gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Falconröhrchen überführt und bei 1250 rpm für 5 min bei 24°C zentrifugiert. Im folgenden Schritt wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in frischem sowie angewärmtem Medium durch Resuspension gelöst, so dass die Zellen vereinzelt vorlagen. Nun konnte die Ermittlung der Zellzahl stattfinden. Es wurde eine der obengenannten Zelldichten gewählt und der Prozess wurde mit der Einsaat der Zellen in eine T₂₅-Flasche mit einem Volumen von 5 ml beendet.

2.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des Coulter-Counter der Fa. B. C. Hierbei wurden 200 µl der jeweiligen Zellsuspensionen gut resuspendiert und mit 9800 µl isotonischer Lösung vermischt (1:50 Verdünnung). Die zu zählende Zell- bzw. Partikelgröße kann am Gerät manuell eingestellt werden und wurde unter Betrachtung der Tumorzellgrößen mit 8-30 µm gewählt. Nach Reinigung der Kapillare mit destilliertem Wasser wurde das Coulter-Gefäß mit dem zu messenden Inhalt in das Gerät gestellt. Durch die an der Kapillare angesaugten Zellen ändert sich der Widerstand bzw. die Leitfähigkeit an der Öffnung der Coulter-Kapillare, weil die Zellen wie elektrische Isolatoren wirken. Diese Änderung der Leitfähigkeit wird in elektrische Impulse umgewandelt, wobei die Frequenz der Änderung ein Maß für die Zellzahl ist und die Amplitude Auskunft über die Zellgröße gibt. Es erfolgt schließlich die Hochrechnung vom Coulter-Counter und es folgte die Angabe der Zellzahl pro ml.

2.1.5 Materialien und Geräte

Zellkulturmedium:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
Fetal Bovine Serum (FBS) Gold
Penicillin/Strptomycin

Hersteller, Ort

PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Subkultivierung und Zellzahlbestimmung:

Phosphate buffered Saline (PBS) –Dulbecco
Trypsin/EDTA (0,05%)
Isoton- Lösung

Hersteller, Ort

Biochrom AG seromed®, Berlin
PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Beckmann Coulter GmbH, Krefeld

Verbrauchsmaterialien:

Falconröhrchen (15 ml oder 50 ml)

T₂₅-Zellkulturflaschen

Pipettenspitzen

Kryoröhrchen

Geräte:

Begasungsbrutschrank I

Begasungsbrutschrank II

Sicherheitswerkbank

Coulter Counter Z2

Stickstoffbehälter Arpege 70

Tiefkühltruhe Ultra Flow

Laborzentrifuge I, Hettich Universal 16 R

Laborzentrifuge II, Hettich Rotina 420 R

Phasenkontrast-Mikroskop Eclipse

4er Objektiv (Plan Fluor 4x/0.13 PhLDL)

10er Objektiv (Plan Fluor 4x/0.13 PhLDL)

Hersteller, Ort

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Nalgene® Labware, VWR International
GmbH, Darmstadt**Hersteller, Ort**

Zapf Instruments, Sarstedt

Varolab® GmbH, Giesen

Zapf Instruments, Sarstedt

Beckmann Coulter GmbH, Krefeld

Air Liquide GmbH, Düsseldorf

Sanyo, Ewald Innovationstechnik GmbH,
Bad Nenndorf

Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen

Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen

Nikon, Düsseldorf

Nikon, Düsseldorf

Nikon, Düsseldorf

2.2 Wirkstoffe

2.2.1 Panitumumab

Der Wirkstoff Panitumumab mit dem Handelsnamen Vectibix®, der von der Firma Amgen GmbH, München produziert wird, wurde flüssig in 5 ml oder 10 ml durchsichtigen Injektionsflaschen geliefert. Es handelt sich um eine sterile, farblose Flüssigkeit, in der teilweise äußerst kleine Proteinpartikel zu erkennen waren. Die Aufbewahrung erfolgte nach Anleitung im Dunkeln bei 6-8°C.

Ein 5 ml Fläschchen enthielt 100 mg Panitumumab, 29 mg Natriumchlorid, 34 mg Natriumacetat und H₂O. Die Konzentration betrug somit 20 mg/ml und mit dem Molekulargewicht von 147 kD konnte die Stoffmenge berechnet werden.

Die gelieferte Lösung wurde als Stammlösung (138,6 µM) verwendet und jeweils kurz vor der Wirkstoffzugabe für die verschiedenen Konzentrationen mit Medium verdünnt (Tab. 1).

Tab. 1: Übersicht über die für die verschiedenen Versuche angesetzten Verdünnungen von Panitumumab

Endkonzentration im Ansatz	Angesetzte Verdünnung Stammlösung : Medium	Pipettiertes Volumen pro ml Kulturmedium
5 μM	unverdünnt	36 μl
1 μM	1 : 10	72 μl
500 nM	1 : 10	36 μl
100 nM	1 : 100	72 μl
50 nM	1 : 100	36 μl
25 nM	1 : 100	18 μl
10 nM	1 : 1000	72 μl
5 nM	1 : 1000	36 μl
1 nM	1 : 1000	7,2 μl

2.2.2 Sorafenib

Sorafenib, mit dem Handelsnamen Nexavar®, gehört zu den Multikinaseinhibitoren. Es besitzt eine molare Masse von 464,83 g/mol und die Strukturformel $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{ClF}_3\text{N}_4\text{O}_3$. 5 mg Sorafenib wurden von der Firma Campro Scientific in einer Braunflasche geliefert.

Das Ansetzen der Stammlösung erfolgte nach Anleitung mit Methanol. Durch Lösen des Feststoffes in 1 ml Methanol lag eine Konzentration von 10,8 mmol/l vor. Dann wurde die Stammlösung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Sorafenib wurde für Wachstumsversuche in einer Konzentration von 4 μM verwendet. Hierfür wurde das Sorafenib kurz vor der Wirkstoffzugabe mit Kulturmedium im Verhältnis 1:100 vermischt. Bei der Zugabe zu den Zellen wurden 37 μl der 1:100 Verdünnung pro ml Endvolumen hinzugefügt. Das zelltoxische Methanol hatte bei diesem Verhältnis einen Volumenanteil von 0,037%. Aus der experimentellen Erfahrung des Strahlenbiologischen Labors der Universität Rostock ist bekannt, dass diese Konzentration an Methanol das Wachstum dieser Zellen nicht beeinträchtigt.

2.3 Wachstumsversuche

Das Erstellen einer Wachstumskurve ist für die Beurteilung des Wachstums einer Zellkultur von entscheidender Bedeutung. In der Regel werden drei charakteristische Stadien unterschieden. Nach der Aussaat liegt die Latenz- oder auch Lag-Phase vor, in der sich die durch Trypsin abgekugelten Zellen an der Matrix der Kulturflaschen wieder festhaften, sich ausbreiten und auf

erste Zellteilungen vorbereiten. Diese Phase beschreibt die Adaptation der Zellen an eine neue Umgebung und sollte beendet sein, bevor eine Wirkstoffzugabe erfolgte.

Die nächste Phase ist die so genannte Log-Phase, in der sich die Zellkultur durch ein exponentielles Wachstum auszeichnet. Diese Phase lag vor, wenn die Zellen für experimentelle Ansätze verwendet wurden und eignet sich für die Ermittlung der Zellpopulationsverdopplungszeit.

Als letztes schließt sich die stationäre Phase an. Zellteilungen sind nur noch vereinzelt vorhanden, weil zum einen ein Nährstoffmangel durch die erhöhte Zelldichte vorliegen kann oder zum anderen Abbaustoffe toxisch wirken können. Die Kontaktinhibition ist für die untersuchten Tumorzelllinien nicht typisch.

2.3.1 Allgemeine Durchführung

Für das Ansetzen der Wachstumskurven wurde eine Zellkultur verwendet, deren Konfluenz geringer als 80% betrug. Die Zellen wurden aus der Kulturflasche abtrypsiniert und die Zellzahl ermittelt. Eine Zelldichte von 1×10^4 Zellen wurde gewählt, weil sich diese Konzentration in Vorversuchen als günstig für die Analyse zytotoxischer bzw. zytostatischer Ansätze erwiesen hatte. Die Einsaat erfolgte in 24er Wellplatten. Die Wachstumsfläche eines Wells betrug $1,9 \text{ cm}^2$ und die Zellen wurden in 1 ml Medium (ggf. inklusive Wirkstoff) kultiviert.

Die Zellzahl im nativen Ansatz wurde über 6 Tage durch eine Dreifachbestimmung ermittelt. Erfolgte eine Wirkstoffzugabe, so fand diese 24 h nach Einsaat statt.

Die sich anschließenden Berechnungen und die grafischen Darstellungen wurden wie in allen folgenden Versuchen mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft, Redmond/Washington, USA) durchgeführt. Und die statistische Berechnung erfolgte mit dem Student's T-Test

2.3.2 Wachstum unter Einfluss von Panitumumab

Die Wachstumskurven wurden mit Panitumumab in zwei verschiedenen Ansätzen mit jeweils fünf verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. In einem Ansatz wurde Panitumumab in hohen Konzentrationen von 50 nM - 5 μ M eingesetzt und in einem anderen Ansatz wurden niedrigere Konzentrationen von 1 nM - 50 nM gewählt. Am Tag der Wirkstoffzugabe (24 h nach Einsaat) wurde die Zellzahl aus einer Dreifachbestimmung ermittelt, die der Ausgangswert für alle Konzentrationen und die Kontrolle war. Über fünf weitere Tage wurde dann für jede Konzentration die Zellzahl aus drei Wells ermittelt.

Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt und anschließend leicht angewärmtes 0,25%iges Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben. Nach dem Lösen der Zellen erfolgte die Zellzahlbestimmung wie in 2.1.4 beschrieben.

2.3.3 Wachstumskurven unter Einfluss von Sorafenib und Panitumumab

Der Ablauf der Durchführung war identisch mit dem in Abschnitt 2.3.1. Untersucht wurde das Wachstumsverhalten von HT-29-Zellen und A549-Zellen mit Sorafenib allein (4 μ M) und in Kombination mit 50 nM bzw. 100 nM Panitumumab. Neben der nativen Wachstumskontrolle wurde zum Vergleich im Ansatz Panitumumab mit den Konzentrationen von 50 nM und 100 nM gewählt.

2.3.4 Materialien und Geräte

Kultivierung und Wirkstoffe:

24er Wellplatten

Panitumumab

Sorafenib

Methanol

Zellzahlbestimmung:

0,25% Trypsin/EDTA

Hersteller, Ort

TPP (Techno Plastic Products AG)

Tarsadingen, Schweiz

Amgen GmbH, München

Campro Scientific, Berlin

Baker, Deventer Holland

Hersteller, Ort

Biochrom AG seromed®, Berlin

2.4 Die Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in den Kulturflaschen oder Wellplatten mit Hilfe des Linearbeschleunigers Siemens Oncor Expression (Healthcare Sector Siemens AG, Erlangen).

In den Grundzügen kann die Funktion des Beschleunigers wie folgt beschrieben werden: Die von einem Injektor kommenden Elektronen werden auf einer linearen Strecke mit Hilfe eines elektrischen Hochfrequenzfeldes beschleunigt, das mit 3 GHz schwingt. Am Ende dieser Strecke treten die Elektronen durch ein dünnes Fenster aus, erfahren eine Umlenkung von 270° und treffen dann auf ein Bremsstrahltarget. Bei dieser Abbremsung der Elektronen werden hoch energetische Photonen mit einer Energie von 6 MeV (festgelegte Maximalenergie) frei. Ein Kollimatorsystem begrenzt das Strahlenbündel auf die gewünschte Feldgröße, in der sich eine Plexiglasscheibe mit den zu bestrahlenden Zellen befand.

Für die Versuche wurden Dosen von 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy verwendet, die sich durch unterschiedliche Bestrahlungszeiten ergaben. Die Dosisleistung betrug 3,75 Gy/min.

2.5 Metabolische Aktivität, XTT-Test (EZ4U)

Bei dem EZ4U-Test handelt es sich um einen nicht radioaktiven Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest. Er beruht auf der Eigenschaft von lebenden Zellen, schwach gefärbte Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate umzubauen. Diese Reaktion wird von der mitochondrialen Dehydrogenase katalysiert. Da für diese Reduktion intakte Mitochondrien notwendig sind, die wenige Minuten nach Absterben der Zelle inaktiv werden, dient der Test indirekt auch als Unterscheidungsmerkmal von lebenden und toten Zellen. Pro Ansatz und Versuch erfolgte eine Achtfachbestimmung.

2.5.1 Metabolische Aktivität unter Einfluss von Panitumumab

Es wurden 1×10^3 Zellen pro Well eingesät und die Abhängigkeit der metabolischen Aktivität von Panitumumab (50 nM, 100 nM, 500 nM) mit einer Wirkzeit von 24 h und 48 h untersucht. Für die Durchführung dieses Versuches erfolgte nach der Zellzahlbestimmung die Einsaat von 1×10^3 Zellen/Well in eine 96er Wellplatte mit einem Endvolumen von 200 μ l/Well. 24 h später fand die Wirkstoffzugabe statt. Nach weiteren 24 h bzw. 48 h erfolgte dann die Zugabe der testspezifischen Substanz (XTT), die zu der erklärten Farbreaktion führte. Die Inkubationszeit der Zellen im Begasungsbrutschrank mit dieser Substanz betrug 2,5 h. Danach folgte die Auswertung mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Referenzwellenlänge von 620 nm.

2.5.2 Metabolische Aktivität unter Einfluss von Panitumumab und ionisierender Strahlung

Der gleiche Ansatz wie in 2.5.1 wurde gewählt, um die Wirkung von Panitumumab in Kombination mit der Bestrahlung auf die metabolische Aktivität zu untersuchen. Die Inkubationszeit mit 50 nM, 100 nM und 500 nM Panitumumab betrug analog zu den anderen Versuchen 48 h. Darauf folgte die Bestrahlung der Zellen mit dem Linearbeschleuniger mit einer Dosis von 6 Gy. 30 min nach der Bestrahlung wurde die Testsubstanz hinzugegeben und es schloss sich eine Inkubationszeit mit der Testsubstanz für 2,5 h an, bevor die Auswertung wie oben beschrieben durchgeführt werden konnte.

2.5.3 Materialien und Geräte

Material	Hersteller, Ort
96er Lochplatte	TPP, Tarsadingen Schweiz
EZ4U, Zellproliferations- und Zytotoxizitäts-Ansatz	Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wien
Multichannelpipettenspitzen	Eppendorf GmbH, Hamburg
 Geräte	 Hersteller, Ort
Multichannelpipette I, Eppendorf research 100	Eppendorf GmbH, Hamburg
Multichannelpipette II, Eppendorf research pro 1200	Eppendorf GmbH, Hamburg
ELISA- Reader, anthos zenyth 340 r	anthos Mikrosysteme GmbH

2.6 Indirekter Zellproliferationstest, BrdU

Das Proliferationsverhalten von Zellen in Kultur kann indirekt über ihre DNA-Synthese nachgewiesen werden (S-Phase des Zellzyklus). BrdU (5-bromo-2-desoxyuridin) ist ein nicht radioaktives Pyrimidinanalogon, das an Stelle von Thymidin in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut wird. Das BrdU wird dann mittels ELISA mit einem spezifischen Antikörper immunologisch nachgewiesen. Pro Ansatz und Versuch erfolgte eine Achtfachbestimmung.

2.6.1 BrdU- Einbau in Abhängigkeit von Panitumumab

Nach der Zellzahlbestimmung wurden 1×10^3 Zellen in eine 96er Lochplatte eingesät. Nach 24 h erfolgte die Wirkstoffzugabe von 50 nM, 100 nM, oder 500 nM. Die Zellen wurden für weitere 48 h mit Panitumumab inkubiert, bevor die BrdU-Lösung hinzugegeben wurde und sich eine Synthesezeit von 2,5 h im Brutschrank anschloss. Der weitere Ablauf entsprach der Anleitung des Zellproliferationskits (Roche Diagnostics GmbH). Der BrdU-Antikörper, der nach dem Fixieren der Zellen hinzugefügt wurde, wurde für 90 min bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen. Als letztes erfolgten die Waschung und die Substratzugabe. Nach weiteren 30 min war eine ausreichende Farbentwicklung vorhanden, die Reaktion wurde mit 25 μ l Schwefelsäure gestoppt und die Messung mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm durchgeführt.

2.6.2 BrdU-Einbau in Abhängigkeit von Panitumumab und ionisierender Strahlung

Für die Untersuchung des kombinierten Effektes wurde die Methode wie in 2.6.1 durchgeführt, aber drei zeitlich verschiedene Versuchsschemata gewählt, um möglichst verschiedene Phasen der Reaktion der Zellen auf die Bestrahlung zu erfassen. Die BrdU-Zugabe fand zum Einen eine Stunde vor Bestrahlung statt und die Inkubationszeit betrug insgesamt 2,5 h und 24 h, zum Anderen wurde das BrdU eine Stunde nach der Bestrahlung hinzugeben und dann der Effekt nach 24 h Synthesezeit beobachtet.

2.6.3 Materialien und Geräte

Material	Hersteller, Ort
96er Lochplatten	TPP, Tarsadingen Schweiz
Cell Proliferation ELISA assay, BrdU	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
1 M Schwefelsäure	Zentralapotheke der Universitätsklinik Rostock
Multichannelpipettespitzen	Eppendorf, Hamburg

Geräte

Es sind die gleichen wie beim XTT-Test (2.5)

2.7 LDH- Freisetzung, Zytotoxizitätstest

Geht aufgrund einer Schädigung von Zellen die Integrität der Zellmembran verloren, so wird das Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH) aus dem Zytosol freigesetzt. Die Aktivität von LDH kann im Überstand der Zellkultur photometrisch ermittelt werden und eine quantitative Aussage über das Ausmaß der Freisetzung getroffen werden. Dabei gibt die LDH-Aktivität indirekt Rückschlüsse über den Zelltod bzw. die Zelllyse.

2.7.1 Allgemeiner Ablauf und Berechnung der Zytotoxizität

Für die Durchführung des LDH-Tests wurden 96er Loch Wellplatten mit einem Endvolumen von 200 µl verwendet und eine Achtfachbestimmung pro Ansatz durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Zelldichten gewählt (25×10^3 Zellen/Well und 1×10^4 Zellen/Well) und Panitumumab in den Konzentrationen 50 nM, 100 nM und 500 nM untersucht. Die Inkubationszeit mit Panitumumab betrug 24 h bzw. 48 h.

Für die Auswertung war das Ansetzen verschiedener Kontrollen nötig. Es lag eine Backgroundkontrolle (Kulturmedium), eine Low-Kontrolle (die Zellkultur ohne Wirkstoff), eine Substanzkontrolle (Medium und 500 nM Panitumumab) und eine Positiv-Kontrolle mit der Zugabe von 100 µl 2%iger Triton-X-Lösung vor. Triton-X schädigt die Zellmembran und ist ein Maß für die maximale LDH-Freisetzung.

Da FBS einen bestimmten Anteil an LDH enthält, das die Backgroundkontrolle erhöhen könnte, wurde ein Teil des Mediums durch 1% FBS-haltiges Medium ersetzt. Dieser Austausch fand 24 h nach Einsaat zusammen mit der Wirkstoffzugabe statt. Die Wirkstoffkonzentrationen sowie die 2%ige Triton-X-Lösung wurden ebenfalls mit dem 1% FBS-haltigen Medium angesetzt.

Für die Auswertung wurden 100 µl des Überstandes mit 100 µl Substrat für 30 min inkubiert, bevor die Reaktion mit 50 µl Salzsäure gestoppt wurde und die Messung am Photometer bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm erfolgte.

Nach der Anleitung konnte die Zytotoxizität dann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zytotoxizität in \%} = \frac{\text{Exp. value} - \text{Low control}}{\text{High control} - \text{Low control}}$$

Exp value = ermittelter Wert für die Zellkultur unter Einfluss von Panitumumab

High control = Positivkontrolle mit Triton-X für maximale LDH-Freisetzung

Low control = ermittelter Wert für die native Zellkultur

2.7.2 Materialien und Geräte

Material

96er Lochplatten

Cytotoxicity Detection Kit (LDH)

1 N HCL

Triton®-X-100

Hersteller, Ort

TPP, Tarsadingen Schweiz

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Zentralapotheke der Universitätsklinik Rostock

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Geräte

Siehe XTT- und LDH-Test

2.8 Koloniebildungstests

Die Koloniebildungstests gehören zu den Langzeitversuchen und werden auch Überlebenstests genannt. Untersucht wird die Proliferationskapazität von Zellen nach einer toxischen Einwirkung. In dieser Hinsicht kann nicht nur die Strahlenempfindlichkeit der beiden Zelllinien untersucht werden, sondern auch getestet werden, ob Panitumumab die Strahlenempfindlichkeit verändert.

Von Bedeutung bei der Auswertung ist die Plating Efficiency und die Überlebensfraktion. Die Plating Efficiency (PE) ergibt sich aus der Anzahl der Zellen (Klone), die fähig sind, innerhalb einer bestimmten Inkubationszeit eine Kolonie zu bilden. Sie ist damit ein Maß für das Zellüberleben und ergibt sich aus der Division der gezählten Kolonien durch die Anzahl der eingesäten Zellen pro Kulturflasche (Sauer, 2003). Eine Kolonie ist mit bloßem Auge sichtbar und muss für die Wertung mindestens aus 50 Zellen bestehen. Mit der PE lässt sich im weiteren Schritt die Überlebensfraktion für eine bestimmte Bestrahlungsdosis und Wirkstoffkonzentration ermitteln, indem man die PE der jeweiligen Strahlendosis für eine bestimmte Konzentration durch die PE der Kontrolle (0 Gy) dividiert. Daraus ergibt sich eine Überlebensfraktion der Kontrolle von 1 oder 100 %. Mit Hilfe einer halblogarithmischen Darstellung entsteht dann eine Zellüberlebenskurve, die eine Dosis-Effekt-Beziehung darstellt.

2.8.1 Allgemeine Durchführung

Für die Durchführung der Koloniebildungstest wurde eine Einsaatdichte von 1×10^3 Zellen/Flasche gewählt und die Kultivierung erfolgte in 25 cm² großen Zellkulturflaschen mit einem Endvolumen von 4,5 ml. Panitumumab wurde mit einer Endkonzentration von 50 nM bzw. 100 nM getestet. Die Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger erfolgte mit den Dosen von 0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy. Auch die nicht zu bestrahlenden Kontrollen wurden mit in den Bestrahlungsraum geführt, um eine vergleichbare Handhabung durch die veränderten Umgebungsfaktoren zu gewährleisten.

Eine Woche nach der Einsaat wurde das Medium gewechselt bevor die Zellen nach weiteren 5 bzw. 7 Tagen fixiert und gefärbt wurden. Hierbei wurde das Kulturmedium abgegossen und die Zellen mit 5 ml vergälltem Ethanol (70%) für 10 min fixiert. Nach der Einwirkzeit wurde der Alkohol entfernt und die Zellen mit Kristallviolettlösung (1%) gefärbt. Dieses wurde erneut verworfen, bevor die Flaschen vorsichtig mit Leitungswasser gespült und bei Raumtemperatur getrocknet wurden. Die Zählung fand am Phasenkontrastmikroskop statt.

2.8.2 Materialien und Geräte

Material	Hersteller, Ort
T ₂₅ -Zellkulturflaschen	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Ethanol (70%) ,vergällt	Zentralapotheke der Universitätsklinik Rostock
Kristallviolett-Lösung 1%	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Geräte	Hersteller, Ort
Phasenkontrast-Mikroskop Eclipse	Nikon, Düsseldorf

2.9 Immunfluoreszenz (Immunhistochemische Untersuchung)

2.9.1 Das Prinzip des γ -H2AX-Nachweises

Zentrale Bedeutung für den Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt das Histon H2AX, das ein universeller Bestandteil des Chromatins ist. Nach Induktion von Doppelstrangbrüchen zum Beispiel durch ionisierende Strahlung wird die Histon H2A-Variante „H2AX“ innerhalb weniger Minuten mittels einer Proteinkinase am carboxyterminalen Motiv am Serin phosphoryliert. Das Produkt dieser kovalenten Modifikation ist das γ -H2AX, welches die antigene Determinate (Epitop) des Primärantikörpers darstellt, an die dieser mit seiner hochspezifischen Bindungsdomäne (Paratop) bindet. Ein mit Fluorophor markierter Sekundärantikörper bindet wiederum spezifisch an das Epitop des Primärantikörpers. Mit dem Fluoreszenzmikroskop ist es möglich, den fluoreszierenden Sekundärantikörper mit monochromatischem Licht einer spezifischen Wellenlänge sichtbar zu machen. Die an die DNA-Doppelstrangbrüche akkumulierten γ -H2AX-Bereiche lassen sich als sogenannte „Foci“ darstellen und sind dabei direkt proportional zur Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche.

2.9.2 Probenvorbereitung

Es wurden 1×10^4 Zellen auf einem Objektträger mit einer kleinen Kammer (Wachstumsfläche) ausgesät. Das Endvolumen betrug 1 ml. Nach 24 h erfolgte die Wirkstoffzugabe von 50 nM Panitumumab. Nach weiteren 48 h Stunden wurden die Zellen bei 6 Gy bestrahlt. Im ersten Ansatz fand die Fixierung eine halbe Stunde nach der Bestrahlung statt, im zweiten Ansatz wurden die Zellen nach einer Reparaturzeit von 24 h fixiert.

Zunächst wurde das Medium abgegossen, die Kammern vorsichtig vom Objektträger mit Hilfe eines Schiebers gelöst und die Zellen in einer Küvette mit PBS gespült. Im ersten Schritt wurden

die Zellen auf dem Objektträger mit einer 2%igen Formaldehydlösung mit PBS für 15 min unter dem Abzug fixiert und im Anschluss folgte die Waschung mit PBS.

Das weitere Arbeiten wurde im Dunkeln fortgesetzt. Auf Eis wurden die Kernmembranen der Zellen für 5 min mit einer 0,2%igen TritonX®-100 Lösung mit PBS und BSA permeabilisiert, bevor sich die Blockierung mit 3%igem BSA und PBS anschloss.

Tab. 2: Darstellung der für den γ -H2AX-Test verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-phospho-Histone H2AX (Ser139)	1 : 100 PBS+1%BSA+0,5%Tween	Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG	1 : 600 PBS+1%BSA+0,5%Tween

Im nächsten Schritt wurde der Primärantikörper (Tab. 2) vorsichtig auf Eis aufgetaut, auf die Objektträger aufgetragen, mit einem Plaste-Deckgläschen bedeckt und für 1 h in einer feuchten Kammer auf den Zellen belassen. Es folgte eine dreimalige Waschung für je 10 min in einer Lösung bestehend aus PBS, BSA (1%) und Tween20 (0,5%), sowie die gleichzeitige Vorbereitung des Sekundärantikörpers. Dieser wurde kurz anzentrifugiert, ebenfalls auf Eis aufgetaut und für 1 h in einer feuchten Kammer auf den Zellen belassen. Das Entfernen des Antikörpers wurde mit Hilfe einer dreimaligen Waschung von je 15 min in PBS und 0,5%igem Tween20 erreicht. Als letztes wurden 15 μ l DAPI/Antifade hinzugeben und der Objektträger mit einem Glasdeckelchen versehen. Um das Austrocknen der Zellen zu vermeiden, wurde das Deckglas zusätzlich mit Nagellack versiegelt. Die Objektträger wurden getrocknet und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Am folgenden Tag fand die Auswertung am Mikroskop statt.

2.9.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Mikroskopie der gefärbten Zellpräparate erfolgte mit dem Fluoreszenzkontrastmikroskop. Dabei wurden mit einem Ölimmersionsobjektiv bei einer 400-fachen Vergrößerung zunächst die bläulich schimmernden Zellkerne gesucht und dann die rötlich leuchtenden „Foci“ mit einer 1000-fachen Vergrößerung eingestellt, wofür man zwei spezielle Filter benötigte (Tab. 3).

Tab. 3: Übersicht über die Anregungsfilter in der durchgeführten Fluoreszenzmikroskopie

Markierung	λ Anregung [nm]	λ Emission [nm]	Fluoreszenz
Sekundärantikörper Alexa Fluor® 594	590	617	Rot
DAPI/Antifade	358	461	Blau

Insgesamt wurden pro Ansatz die „Foci“ von 50 Zellkernen gezählt und der Mittelwert berechnet. Zur Dokumentation wurde zusätzlich die Kamera Kappa DX 40 C verwendet.

2.9.4 Materialien und Geräte

Lösungen und Chemikalien

PBS:

NaCl (137 mM)

KH₂PO₄ (2 mM)

Na₂HPO₄·xH₂O (10 mM)

KCl (2,7 mM)

Bovines Serum Albumin (BSA)

Formaldehyd 37%ig

Tween®20

Triton® X-100

Mab, Primärantikörper (HisH2Ax (Ser139))

Mab, Sekundärantikörper (Alexa Fluor 594)

Dapi/Antifade 0,1 ng/ml

Verbrauchsmaterialien

Objektträger mit Kammer (chamber slides),
LAB-TEK® II

Plaste- Deckgläschen, Thermanox®

Glasdeckgläschen, 60 mm

Geräte

Waage I, sartorius BP 61 S

Waage II, sartorius BL 600

pH- Meter CG 841

Magnetrührer variomag®

Eismaschine

Eisbad 1-6031

Fluoreszenzmikroskop

Digital Camera

Irfan View

Hersteller, Ort

Mallinckrodt Baker, Deventer Holland

Merck KGaA, Darmstadt

Merck KGaA, Darmstadt

Merck KGaA, Darmstadt

Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Merck KGaA, Darmstadt

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Milipore GmbH, Schwalbach/Ts.

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege

Hersteller, Ort

Nalge Nunc Int., Naperville, USA

Nalge Int. NUNC Brand Products, Rochester
(NY), USA

Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co.
KG, Braunschweig

Hersteller, Ort

Sartorius AG, Göttingen

Sartorius AG, Göttingen

Schott AG, Hofheim

Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. &
Co. KG, Bonn

Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen

neolab®, Heidelberg

Nikon, Düsseldorf

Kappa DX 40C, Gleichen

© by irfan skiljan, 2010

3 Ergebnisse

3.1 Wachstumskurven

Anhand von Wachstumskurven war es möglich die spezifische Wachstumskinetik beider Zelllinien zu beurteilen und die Zellpopulationsverdopplungszeiten zu ermitteln. Gleichzeitig konnte bei Zugabe eines Wirkstoffes das Ausmaß der Beeinflussung der Zellproliferation im Vergleich zur nativen Kontrolle dargestellt werden. Dies konnte entweder grafisch erfolgen oder mittels der Berechnung der Zellpopulationsverdopplungszeit geschehen.

3.1.1 Wachstumskurven der A549-Zellen

Für die Untersuchung des Zellwachstums von A549-Zellen in Abhängigkeit von dem EGFR-Antagonisten Panitumumab wurden zwei Spektren unterschiedlicher Dosen untersucht. Zusätzlich wurden Wachstumskurven in der Kombination von Panitumumab zusammen mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib durchgeführt.

3.1.1.1 Wachstum der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab- hoher Dosisbereich

Der Ansatz mit den A549-Zellen mit 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μ M und 5 μ M wurde insgesamt viermal durchgeführt und aus den Ergebnissen die folgende Abb. 4 erstellt. Die Beurteilung der Wachstumskinetik erfolgte mit den drei Wachstumsphasen, die in Abschnitt 2.3 beschrieben sind.

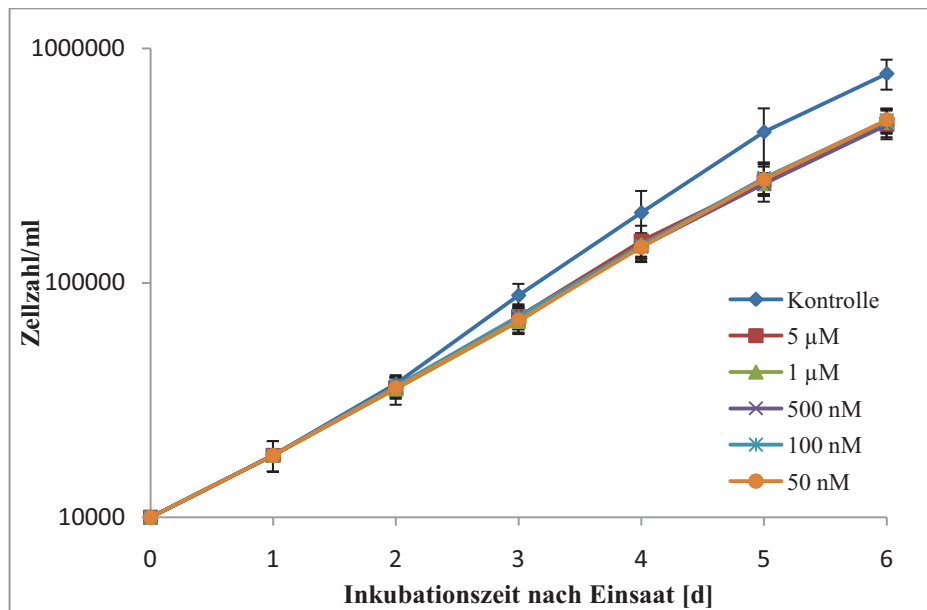


Abb. 4: Wachstum der A549-Zellen in Abhängigkeit von 50 nM - 5 µM Panitumumab und der Inkubationszeit. Einsaatdichte 1×10^4 Zellen/Well. Wirkstoffzugabe am Tag 1. Dargestellt sind MW \pm SD (n=4)

Nach dem 1. Tag war die Lag-Phase abgeschlossen und die A549-Zellen befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase, was bedeutet, dass die Zellen sich ihrem neuen Milieu angepasst haben, an der Matrix hafteten und uneingeschränkt proliferierten. Das stärkste Wachstum der Zellpopulation war zwischen dem 2. und 5. Tag zu erkennen. Vom 5. zum 6. Tag war eine diskrete Abschwächung des Wachstums zu beobachten. Die klassische Plateau-Phase wurde nicht erreicht, was für die Wachstumsexperimente mit Panitumumab beabsichtigt war.

Die Wirkung von Panitumumab auf das Proliferationsverhalten der A549-Zellen konnte in einer Hemmung des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle ab dem 2. Tag beobachten werden. Die Differenz der absoluten Zellzahl von der Kontrolle zu den Ansätzen mit Panitumumab wurde zunehmend größer und erreichte ihr Maximum am 5. und 6. Tag mit einem Unterschied in der Zellzahl von ca. 40%. Eine vollständige Stagnation des Wachstums in Anwesenheit von Panitumumab war nicht zu beobachten. Die beschriebenen Effekte waren unabhängig von der Konzentration von Panitumumab, so dass eine steigende Dosis keine Wirkungsverstärkung zur Folge hatte. Im Einzelversuch wurde die Konzentrationsunabhängigkeit bis 10 µM bestätigt (nicht abgebildet). Ebenso konnte ein Effekt von NaCl als Lösungsmittel von Panitumumab ausgeschlossen werden.

Der beschriebene wachstumshemmende Effekt von Panitumumab war gut zu erkennen. Ein signifikantes Ergebnis lag ab dem 5. Tag vor ($p \leq 0,05$). Noch deutlicher war die Differenz im Wachstum am 6. Tag ($p \leq 0,01$).

Fehler, die sich unter den 4 verschiedenen Ansätzen ergaben, können durch eine Normierung minimiert werden. Dies stellt die folgende Abb. 5 dar, in der jeweils die Kontrolle des jeweiligen

Zähltag 1 auf 1 normiert wurde und die Ansätze mit den verschiedenen Konzentrationen dazu ins Verhältnis gesetzt wurden.

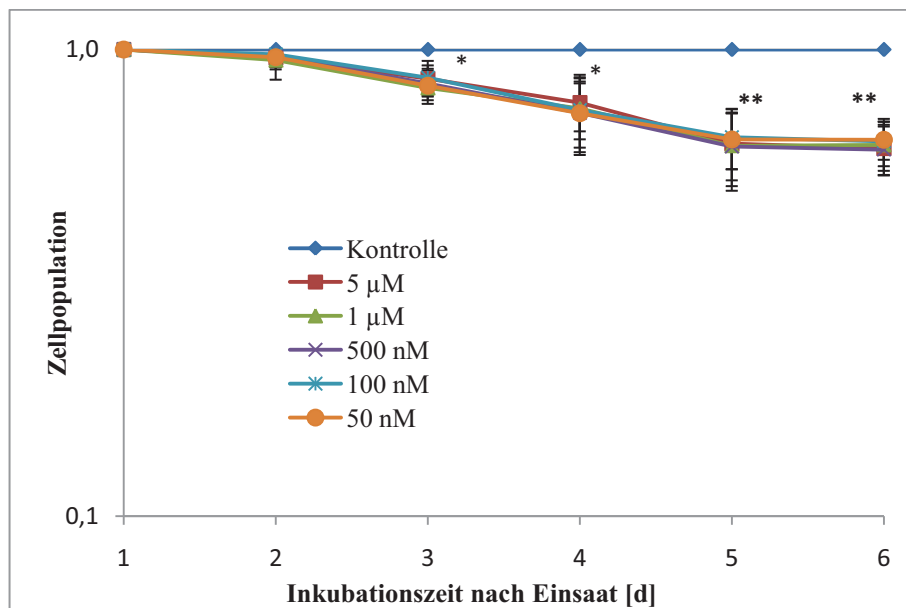


Abb. 5: Zellpopulation der A549-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab und der Inkubationszeit. Normierung für jeden Tag auf die Kontrolle (0 nM). Einsaatdichte 1×10^4 Zellen/Well, Wirkstoffzugabe am 1. Tag. Dargestellt sind berechnete MW \pm SD (n=4). * = $p \leq 0,05$ ** = $p \leq 0,01$

Die Zellpopulation wurde unabhängig von der Panitumumab-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle zunehmend kleiner und es schien sich am 6. Tag ein konstanter Wert einzupendeln. Ab dem 3. Tag war eine signifikante Wachstumsverzögerung zu beobachten ($p \leq 0,05$), die mit der Anzahl an Inkubationstagen an Ausprägung und Signifikanz zunahm.

Die Zellpopulationsverdopplungszeit ist eine weitere Möglichkeit für die Beurteilung der Wachstumskinetik. In Tab. 4 sind die Zellpopulationsverdopplungszeiten für die verschiedenen Inkubationszeiten dargestellt.

Tab. 4: Zellpopulationsverdopplungszeit in Abhängigkeit vom Inkubationstag und der Panitumumab-Konzentration

	Zellpopulationsverdopplungszeit [h]						MW 1.-6.Tag	MW Log-Phase
	1.Tag	2.Tag	3. Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag		
Kontrolle	28,7	23,6	17,2	19,2	19,8	31,1	23,3	18,7
50 nM	28,7	25,4	25,5	22,9	24,4	30,0	26,3	24,3
5 µM	28,7	25,7	23,6	21,7	30,1	31,7	29,9	25,1

Am 1. Tag und 6. Tag war die Zellverdopplungszeit etwas größer als am Tag 2-5, was zum Einen die Lag- Phase widerspiegelte und zum Anderen den Anfang der Plateauphase signalisierte. Die Populationsverdopplungszeiten waren vom 3. bis 5 Tag deutlich kürzer und charakterisierten damit die Log-Phase. Dieser Abschnitt zeichnete sich in der Wachstumskurve durch den linearen Anstieg aus und diente für die lineare Regressionsanalyse.

Die mittels linearer Regressionsanalyse (Einfügen einer exponentiellen Trendlinie vom 3.-5. Tag) gewonnenen Populationsverdopplungszeiten sahen folgendermaßen aus:

Kontrolle	20,21 h
50 nM Panitumumab	24,05 h
5 μ M Panitumumab	24,30 h

Die Zellpopulationsverdopplungszeiten geben die Wachstumsverzögerung, die durch Panitumumab initiiert wurde wieder. Sie betrug 4 h.

3.1.1.2 Wachstum der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab- niedriger Dosisbereich

Mit den hohen Konzentrationen konnte gezeigt werden, dass Panitumumab konzentrations-unabhängige Effekte auf das Zellwachstum hat. Für die Ermittlung der minimalen Konzentration, bei der eine Verzögerung der Zellproliferation auftritt, wurden Wachstumskurven mit den Konzentrationen von 50 nM, 25 nM, 10 nM, 5 nM und 1 nM angefertigt und die Ergebnisse in Abb. 6 grafisch dargestellt.

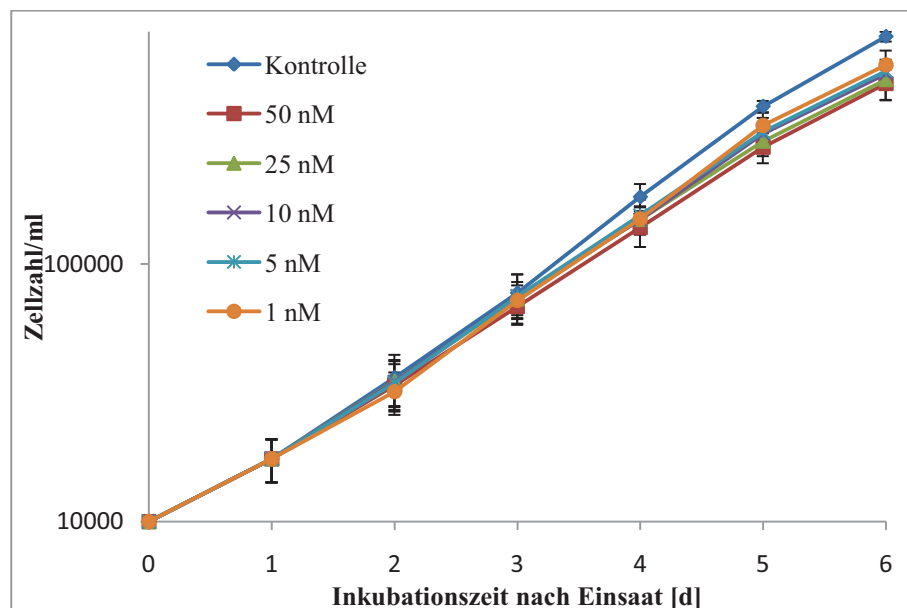


Abb. 6: Wachstum der A549-Zellen in Abhängigkeit von 1 nM - 50 nM Panitumumab und der Inkubationszeit. Einsaatdichte 1×10^4 Zellen/Well. Wirkstoffzugabe am Tag 1. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3). $p \leq 0,05$ 6.Tag

In der Abbildung ist eine Wirkung von Panitumumab im ganzen Dosisbereich beginnend am 3. Tag zu erkennen. Bei 50 nM war das Wachstum nach der Mittelwertanalyse etwas stärker verzögert (Tab. 5), als bei den anderen Konzentrationen, die wiederum zunächst untereinander den gleichen Effekt zeigten. Erst ab dem 5. Tag war die Wirkung konzentrationsabhängig und der Effekt von 1 nM Panitumumab am geringsten. Bei Betrachtung der Standardabweichungen war allerdings ersichtlich, dass der Unterschied zwischen den Konzentrationen nicht signifikant

war (Die Irrtumswahrscheinlichkeit zwischen 50 nM und 1 nM betrug 21%). Im Konzentrationsbereich war mit Ausnahme vom Ansatz mit 1 nM ab dem 5. Inkubationstag eine signifikante Wachstumsverzögerung ($p \leq 0,05$) in Abhängigkeit von Panitumumab festzustellen. Am 6. Tag war in allen Konzentrationen eine signifikante Hemmung der Proliferation durch Panitumumab vorhanden.

Auch für den kleinen Dosisbereich wurde eine Normierung vorgenommen, die in Abb. 7 zur Geltung kommt. Die Größe der Zellpopulationen mit der Zugabe von Panitumumab lag ab dem 4. Tag signifikant unter der Kontrolle. Für den Ansatz mit 50 nM traf dies bereits für den 3. Tag zu. Am 6. Tag war die Zellpopulation bei 1 nM um 23% kleiner als die der Kontrolle, während die Zellpopulation bei 50 nM im Vergleich zur Kontrolle um 35% verringert war. Am 5. Tag befand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen von 1 nM und 50 nM. Die Tendenz eines konzentrationsabhängigen Effektes von Panitumumab war im ganzen Dosisbereich unter 50 nM weiterhin zu beobachten.

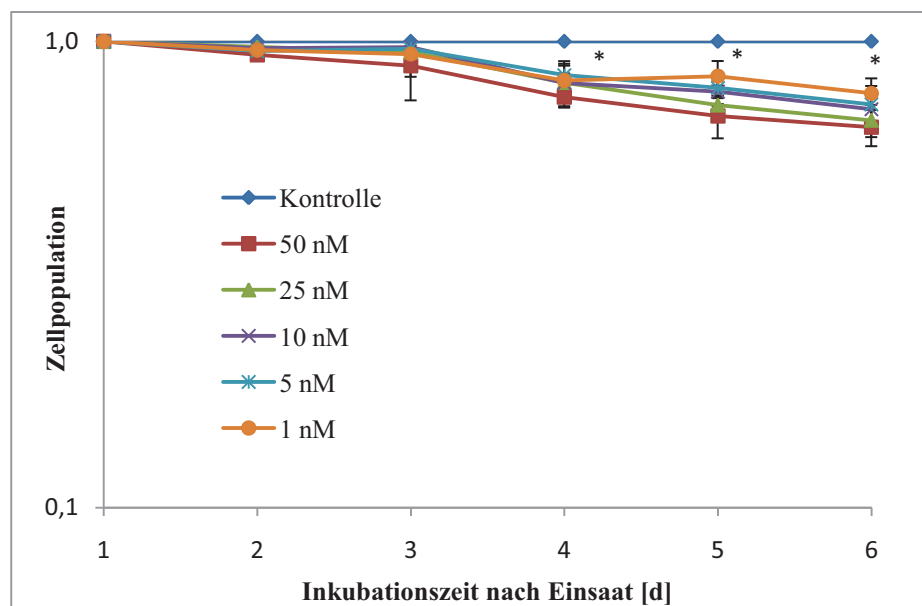


Abb. 7: Zellpopulation der A549-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab und der Inkubationszeit. Normierung für jeden Tag auf die Kontrolle (0 nM). Einsaatdichte 1×10^4 Zellen/Well, Wirkstoffzugabe am 1. Tag. Dargestellt sind berechnete MW \pm SD ($n=3$) * = $p \leq 0,05$

Für die Untersuchung der Zellpopulationsverdopplungszeit wurde wie in 3.1.1.1 vorgegangen und die lineare Regressionsanalyse (mittels Trendlinie) anhand der Werte vom 3.-5. Tag durchgeführt.

Die errechneten Zellpopulationsverdopplungszeiten sind in der folgenden Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Zellpopulationsverdopplungszeiten der A549-Zellen in Abhängigkeit von 1 nM - 50 nM Panitumumab. Berechnet mittels linearer Regressionsanalyse

	Kontrolle	50 nM	25 nM	10 nM	5 nM	1 nM
Zeit [h]	20,5	23,6	23,4	22,7	22,6	21,1

Der konzentrationsabhängige Effekt von Panitumumab im Konzentrationsbereich unterhalb von 50 nM konnte die Werte der Zellpopulationsverdopplungszeit aus dem Vorversuch (hoher Dosisbereich) für die Ansätze der Kontrolle und der Ansatz mit 50 nM bestätigen, während bei den niedrigeren Konzentrationen (1 nM - 10 nM) sichtbar war, dass sie sich zunehmend der Zellpopulationsverdopplungszeit der Kontrolle annäherten und damit für eine verminderte Wirkung von Panitumumab sprachen.

3.1.1.3 Wachstum der A549-Zellen unter dem Einfluss von Panitumumab und Sorafenib

Der Einsatz des Multikinaseinhibitors Sorafenib in Wachstumsversuchen mit den A549-Zellen wurde durchgeführt, um die Kombination mit Panitumumab zu untersuchen, die in Abhängigkeit des Mutationstatus (*KRAS*, *BRAF*) der Zelllinien variieren soll. In Abb. 8 ist die kombinierte Wirkung von Panitumumab und Sorafenib grafisch dargestellt.

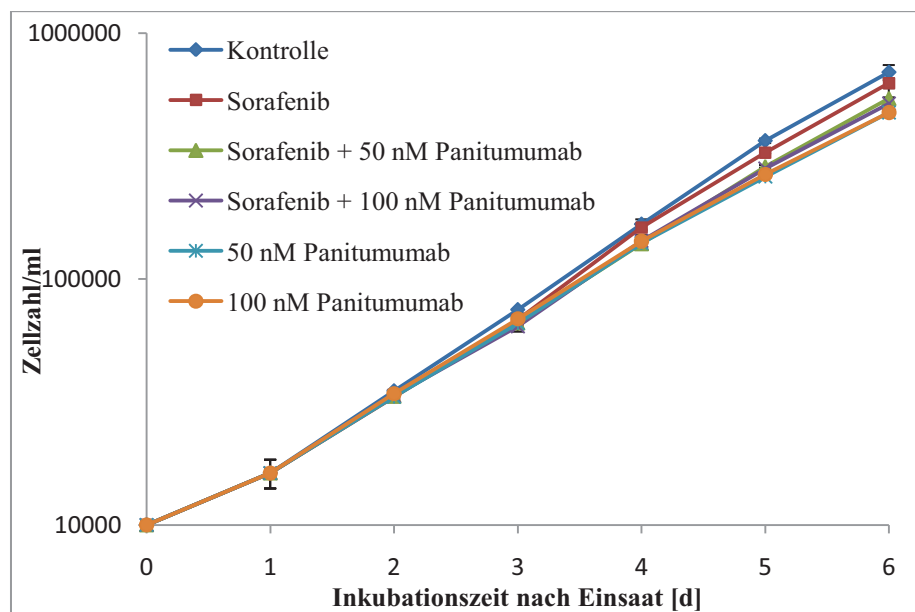


Abb. 8: Wachstum der A549-Zellen in Abhängigkeit von 50 nM bzw. 100 nM Panitumumab und 4 μ M Sorafenib. Einsaatdichte 1×10^4 Zellen/Well. Wirkstoffzugabe am Tag 1. Dargestellt sind MW \pm SD (n=2)

Sorafenib allein hatte in einer Konzentration von 4 μ M einen leicht wachstumsverzögernden Effekt, der besonders am 5. und 6. Tag sichtbar wurde. Bei der Kombination von Sorafenib und Panitumumab war der hemmende Effekt auf das Wachstum verstärkt, aber die Wirkung war nicht so groß wie diejenige von Panitumumab allein. Das heißt Sorafenib hatte einen leicht hemmenden Effekt auf die Wirkung von Panitumumab.

Am 5. Tag war der hemmende Effekt auf das Zellwachstum durch die zwei Substanzen signifikant ($P < 0,05$). Der Unterschied des wachstumsverzögernden Effekts zwischen Sorafenib und Panitumumab allein (50 nM u. 100 nM) war signifikant, genauso wie die beschriebene

Differenz zwischen der Kombination aus Sorafenib + 50 nM Panitumumab und 50 nM Panitumumab allein.

Am 6. Tag waren die Zellzahlen der Panitumumab enthaltenden Ansätze signifikant kleiner als die der Kontrolle.

3.1.2 Wachstumskurven der HT-29-Zellen

Im Gegensatz zu den A549-Zellen wurden bei den HT-29-Zellen die Wachstumsversuche nur im hohen Dosisbereich von Panitumumab durchgeführt und die Wachstumskurven in der Kombination mit Sorafenib angefertigt.

3.1.2.1 Wachstum der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab

Um das Wachstum der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab zu untersuchen, wurden Konzentrationen im Spektrum von 50 nM - 5 μ M gewählt und drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse sind der Abb. 9 zu entnehmen.

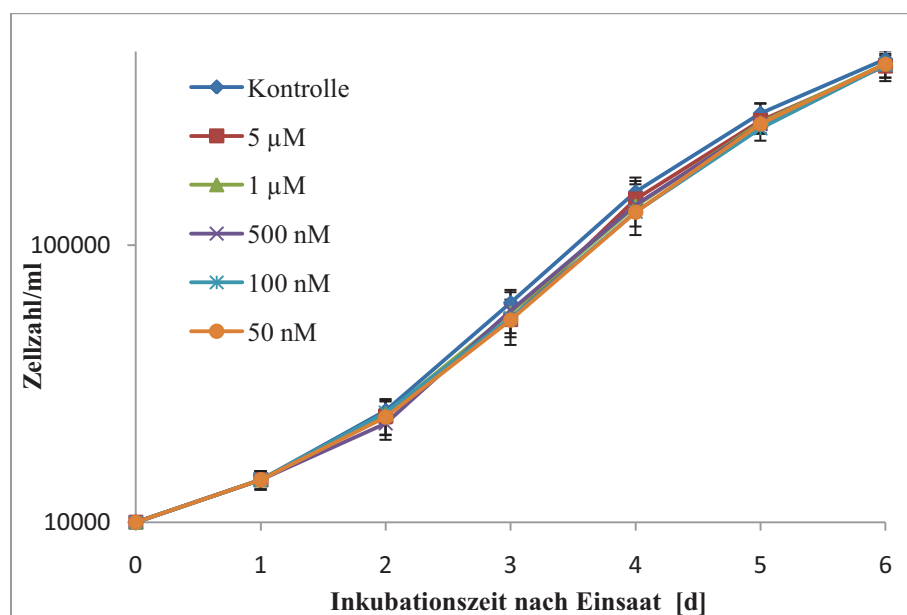


Abb. 9: Wachstum der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von 50 nM - 5 μ M Panitumumab und der Inkubationszeit. Einsaatdichte 1×10^4 Zellen/Well. Wirkstoffzugabe am Tag 1. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3)

Das Wachstum der HT-Zellen zeigte im Vergleich zu den A549-Zellen eine verlängerte Lag-Phase (siehe auch Tab. 4), die nach dem 2. Tag beendet war. Die Log-Phase befand sich zwischen dem 3. und 5. Tage. Vom 5. bis 6. Tag verlangsamte sich das Wachstum und es deutete sich die Plateau-Phase an, die sich durch eine verlängerte Verdopplungszeit in der Tab. 6 auszeichnete.

Tab. 6: Zellpopulationsverdopplungszeiten der HT-29-Zellen in Abhängigkeit vom Inkubationstag und der Panitumumab-Konzentration.

	Zellpopulationsverdopplungszeit [h]						MW	MW Log-
	1.Tag	2.Tag	3. Tag	4.Tag	5.Tag	6.Tag	Tag 1-6	Phase
Kontrolle	56,9	30,8	16,5	15,8	26,0	42,2	31,4	19,4
50 nM	56,9	35,0	19,4	16,5	22,3	37,2	31,2	19,4
5 μ M	56,9	34,4	19,4	13,9	26,1	41,6	32,1	19,8

Die Zellpopulationsverdopplungszeiten waren am 1. und 6. Tag im Verhältnis zu den A549-Zellen deutlich verlängert. Die Kontrolle (ohne Wirkstoff) verlief diskret oberhalb der Kurven der Panitumumab-enthaltenden Ansätze. Ein proliferationshemmender Effekt durch Panitumumab konnte unter Betrachtung der Standardabweichungen aber nicht festgestellt werden.

Für die lineare Regressionsanalyse wurde analog zu den A549-Zellen der 3.-5. Tag gewählt, da auch hier die Zellpopulationsverdopplungszeiten am kürzesten waren.

Kontrolle	19,9 h
50 nM Panitumumab	19,9 h
5 μ M Panitumumab	20,3 h

Bei der Betrachtung der errechneten Zellpopulationsverdopplungszeiten wurde erneut deutlich, dass kein wachstumshemmender Effekt unter Einfluss von Panitumumab in den HT-29-Zellen beobachtet werden konnte.

3.1.2.2 Wachstum der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab und Sorafenib

Sorafenib wurde primär bei den HT-29-Zellen eingesetzt, um eine in der Literatur beschriebende Sensitivierung der HT-29-Zellen gegenüber Panitumumab zu erreichen. Dabei wurde Sorafenib in einer Konzentration von 4 μ M eingesetzt und Panitumumab in Konzentrationen von 50 nM - 100 nM gewählt. Eine grafische Darstellung der Ergebnisse ist in der folgenden Abb. 10 zu sehen.

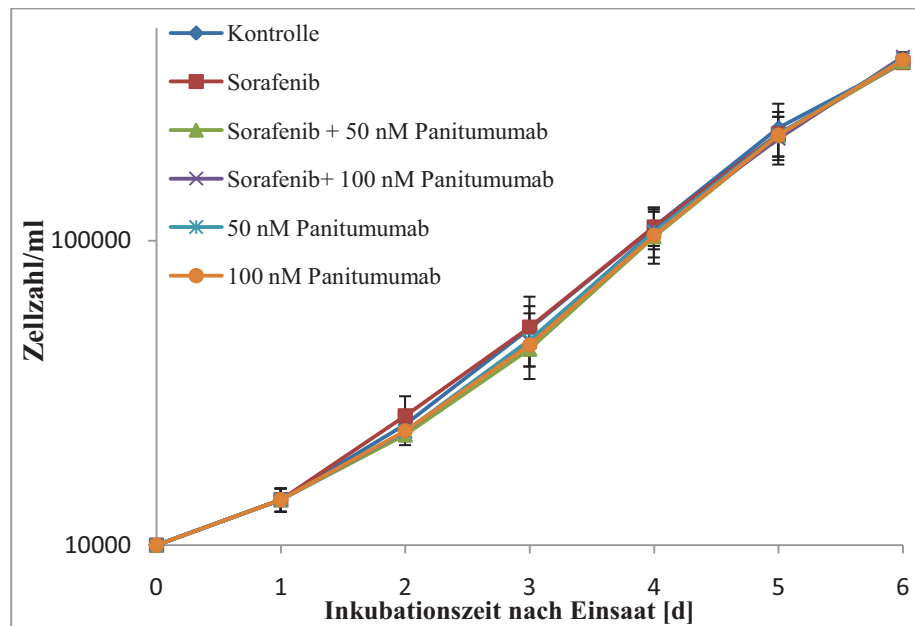


Abb. 10: Wachstum der HT-29-Zellen mit 50 nM bzw. 100 nM Panitumumab und 4 μ M Sorafenib. Einsaatdichte 1×10^4 Zellen/Well. Wirkstoffzugabe am Tag 1. Dargestellt sind MW \pm SD (n=3)

Es war deutlich sichtbar, dass Sorafenib weder allein, noch in Kombination mit Panitumumab einen Effekt auf das Proliferationsverhalten der HT-29-Zellen hatte. Gerade zum Ende der Wachstumskurve sind alle Ansätze mit der Kontrolle nahezu deckungsgleich.

3.2 Metabolische Aktivität

3.2.1 Metabolische Aktivität unter Einfluss von Panitumumab

Der EGF-Rezeptor ist für die komplexe Regulation verschiedener Signalwege der Zelle verantwortlich. Ob über dessen Bindung bzw. Hemmung (Panitumumab) auch die metabolische Aktivität der Zellen beeinflusst wird, sollte mit Hilfe des XTT-Tests untersucht werden. Die Ergebnisse werden in der Abb. 11 dargestellt.

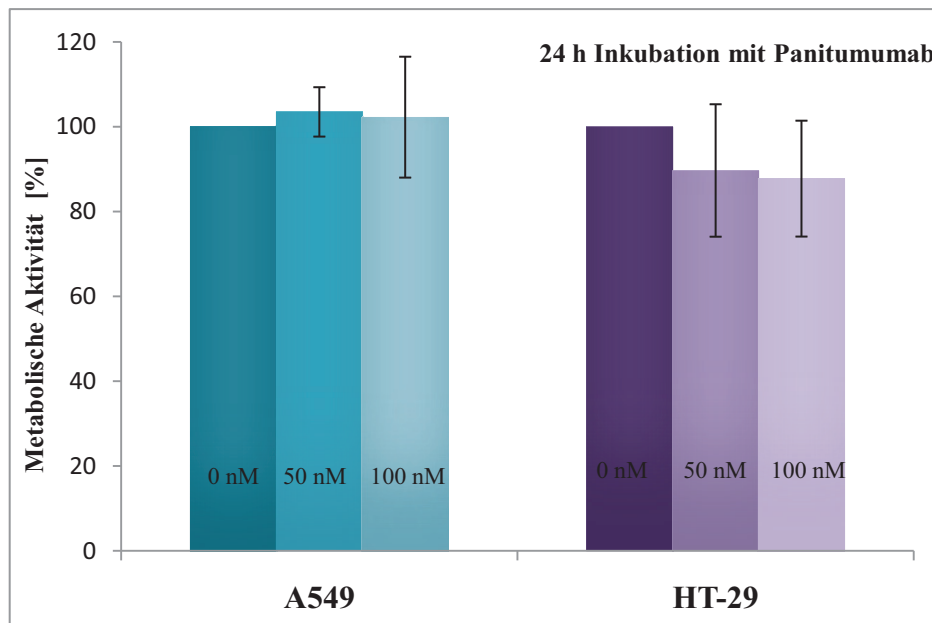


Abb. 11: Metabolische Aktivität von A549-Zellen und HT-29-Zellen bei Inkubation mit 50 nM bzw. 100 nM Panitumumab. Inkubationszeit 24 h, Einsaatdichte 1×10^3 Zellen/Well. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD (n=4)

Die mit dem ELISA-Reader gemessene Extinktion wurde für die Kontrolle (nur Zellen der jeweiligen Zelllinie, 0 nM Panitumumab) mit einer metabolischen Aktivität von 100% gleichgesetzt. Die Werte aus den Ansätzen mit 50 nM bzw. 100 nM Panitumumab wurden dazu ins Verhältnis gesetzt.

Bei den A549-Zellen war kein Effekt unter der Zugabe von Panitumumab zu erkennen. Die Mittelwerte variierten um weniger als 5%. In den HT-29-Zellen konnte in Anwesenheit von Panitumumab die metabolische Aktivität um 10-12% gesenkt werden. Dieser Effekt lag jedoch im Bereich der einfachen Standardabweichung.

3.2.2 Metabolische Aktivität unter Einfluss von Panitumumab und Bestrahlung

Um die Wirkung der Bestrahlung auf die Metabolische Aktivität zu untersuchen, wurden die Zellen bei 6 Gy bestrahlt und zusätzlich für 48 h mit Panitumumab inkubiert, um die Kombination mit ionisierender Strahlung zu untersuchen. Die Zugabe des Testsubstrates erfolgte unmittelbar nach der Bestrahlung. Es wurde eine Normierung auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, 0 nM Panitumumab) durchgeführt und die Abb. 12 (A549-Zellen) und Abb. 13 (HT-29-Zellen) erstellt.

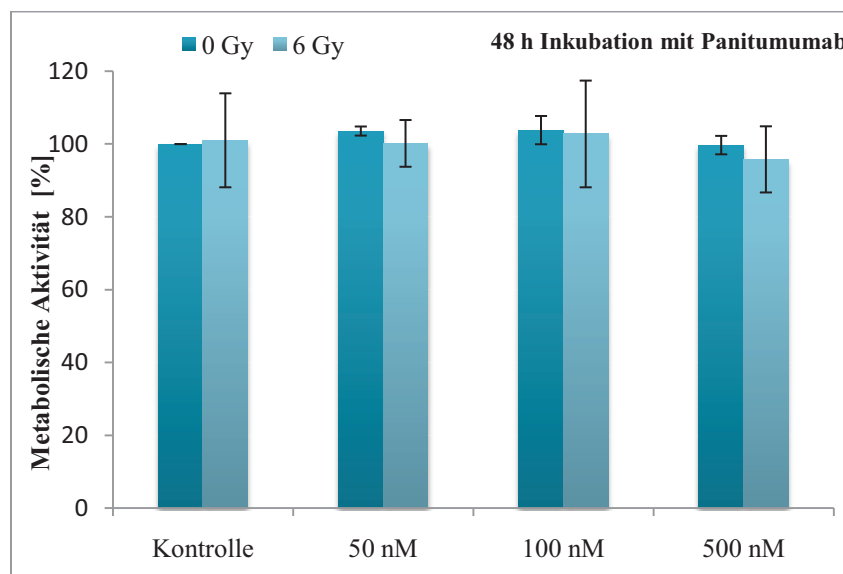


Abb. 12: Metabolische Aktivität der A549-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab und Bestrahlung. Einsaatdichte (1×10^3 Zellen/Well), Normierung auf die Kontrolle (0 nM, 0 Gy). Darstellung von MW \pm SD (n=3)

Auch nach 48 h Inkubationszeit mit Panitumumab waren keine sichtbaren Effekte durch die Zugabe von Panitumumab in den A549-Zellen zu erkennen. Des Weiteren gab es keinen Unterschied in der metabolischen Aktivität zwischen dem bestrahlten und unbestrahlten Ansatz. Eine kombinierte Wirkung von Panitumumab und Bestrahlung konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Der gleiche Ansatz wurde mit den HT-29-Zellen durchgeführt und die Ergebnisse werden in der folgenden Abb. 13 abgebildet.

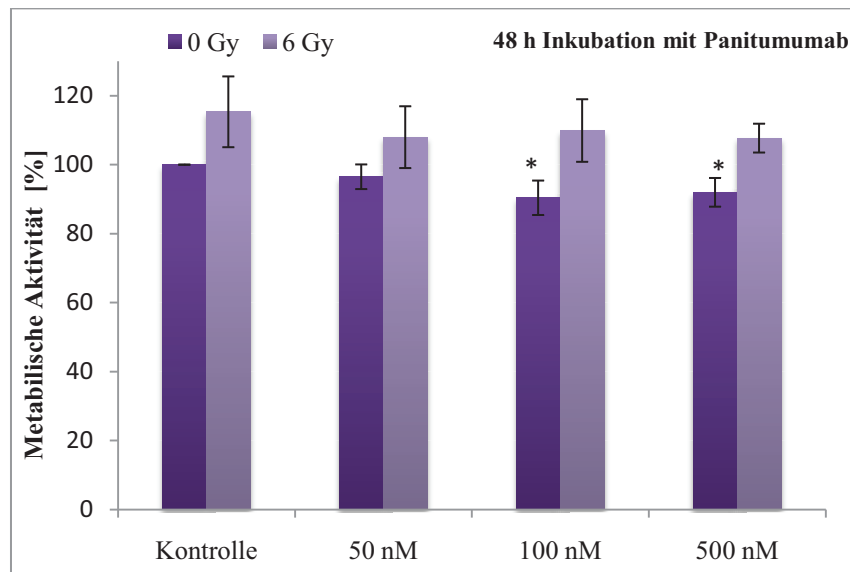


Abb. 13: Metabolische Aktivität der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab und Bestrahlung. Einsaatdichte (1×10^3 Zellen/Well), Normierung auf die Kontrolle (0 nM, 0 Gy). Darstellung von Mittelwerten \pm SD (n=3), *= $p \leq 0,05$

Bei den HT-29-Zellen war in allen Ansätzen eine erhöhte metabolische Aktivität in den bestrahlten Zellen zu beobachten. Die Differenz zum jeweiligen unbestrahltem Ansatz betrug durchschnittlich 15%, wobei die Zugabe von 100 nM und 500 nM Panitumumab ein signifikantes Ergebnis zum unbestrahltem Ansatz zur Folge hatte ($p \leq 0,05$). In Abhängigkeit von Panitumumab war tendenziell eine minimale Abnahme der metabolischen Aktivität zu erkennen, die unabhängig von der Bestrahlung war.

3.3 Untersuchung der Zellproliferation mittels BrdU-Test

3.3.1 BrdU-Einlagerung unter Einfluss von Panitumumab

Die Einlagerung von BrdU wurde als weiteres Untersuchungsverfahren angewandt, um die Proliferationsfähigkeit der A549-Zellen und HT-29-Zellen unter dem Einfluss von Panitumumab zu untersuchen. Die folgende Abb. 14 gibt die Verhältnisse der A549-Zellen wieder, während die Abb. 15 den BrdU-Einbau unter Einfluss von Panitumumab für HT-29-Zellen zeigt.

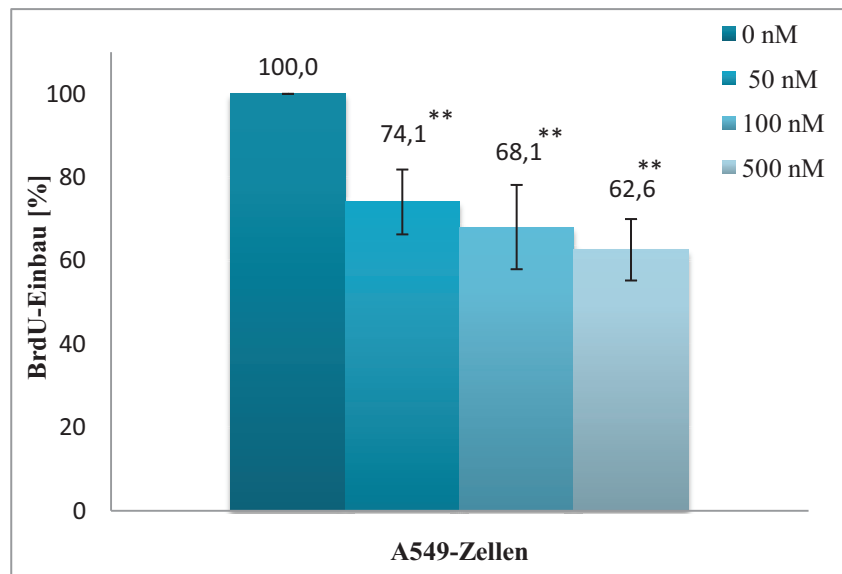


Abb. 14: BrdU-Einbau in die A549-Zellen in Abhängigkeit von einer 48-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab (50 nM - 500 nM). BrdU-Einbauzeit 2,5 h. Einsaatdichte 1×10^3 Zellen/Well. Normierung auf die Kontrolle (0 nM) = 100%. Darstellung von $MW \pm SD$ ($n=5$) ** $P \leq 0,01$ zur Kontrolle (0 nM)

In den Versuchen mit den A549-Zellen war deutlich eine Abnahme der BrdU-Einlagerung unter der Zugabe von Panitumumab zu erkennen. Mit zunehmender Konzentration an Panitumumab war dieser Effekt stärker ausgeprägt. Der Unterschied zwischen 50 nM und 500 nM war hierbei signifikant ($p \leq 0,05$), sowie sich der Effekt zwischen den Ansätzen mit Panitumumab und der Kontrolle in allen Konzentrationen als signifikant zeigte ($p \leq 0,01$).

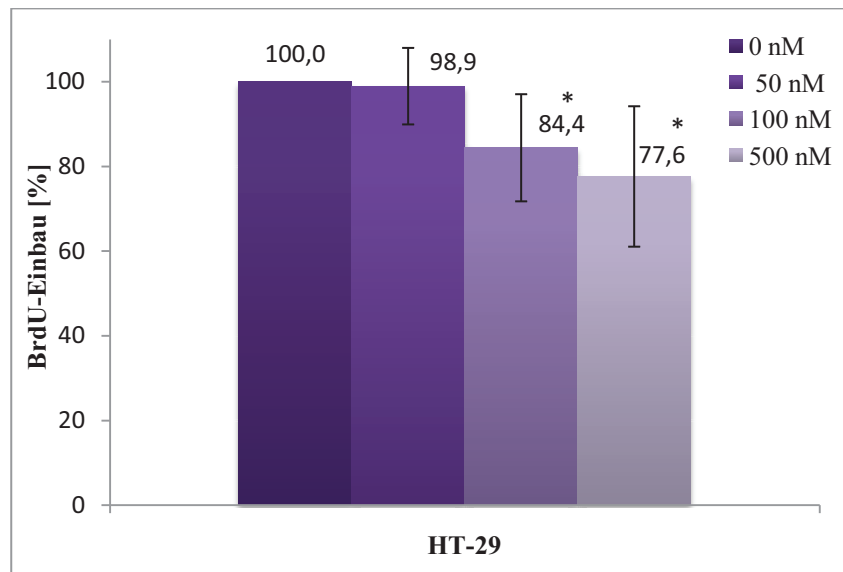


Abb. 15: BrdU-Einbau in die HT-29-Zellen in Abhängigkeit von einer 48-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab (50 nM - 500 nM). BrdU-Einbauzeit 2,5 h. Einsaatdichte 1×10^3 Zellen/Well. Normierung auf die Kontrolle (0 nM) = 100%. Darstellung von $MW \pm SD$ (n=5) *= $p \leq 0,05$ zur Kontrolle (0 nM)

Bei den HT-29-Zellen konnte ebenfalls ein Effekt durch Panitumumab (ab 100 nM) auf die BrdU-Einlagerung und damit die Synthesephase der Zellen festgestellt werden, der aber weniger stark ausgeprägt war als derjenige bei den A549-Zellen. Für die Konzentrationen von 100 nM und 500 nM Panitumumab lag auch in den HT-29-Zellen ein signifikantes Ergebnis ($p \leq 0,05$) vor.

3.3.2 BrdU-Einlagerung unter Einfluss von Panitumumab und Bestrahlung

Es wurden insgesamt drei verschiedene Ansätze gewählt, um den Effekt der Bestrahlung in der Kombination mit Panitumumab zu untersuchen. Die BrdU-Einbauzeit variierte zwischen 2,5 h und 24 h, genauso wie der Zeitpunkt der BrdU- Zugabe (vor oder nach der Bestrahlung).

3.3.2.1 BrdU-Einbau in A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab und ionisierender Strahlung

Hinsichtlich der Inkubationszeit mit Panitumumab (48 h) war der erste Ansatz mit Bestrahlung analog zu dem Versuch ohne Bestrahlung. Die BrdU-Zugabe erfolgte eine halbe Stunde vor der Bestrahlung. Die Ergebnisse finden sich in der Abb. 16 wieder.

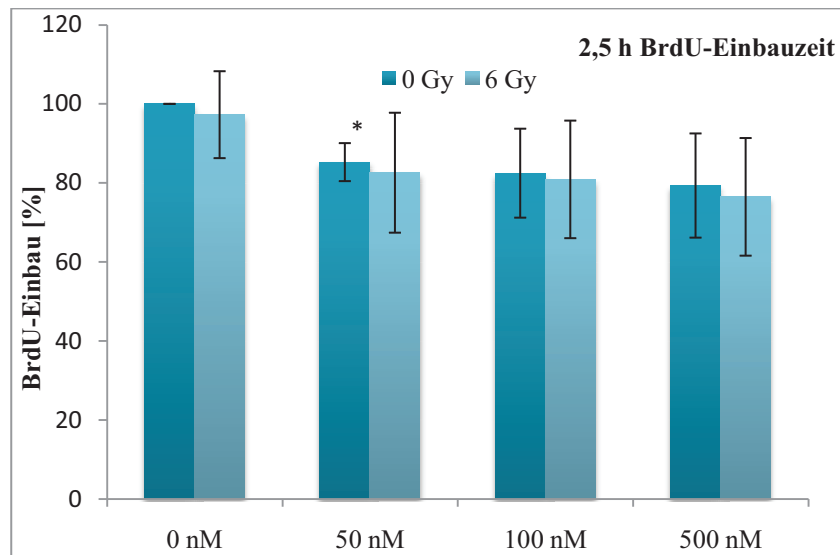


Abb. 16: BrdU-Einbau in A549-Zellen in Abhängigkeit von einer 48-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab und 6 Gy Bestrahlung. BrdU- Einbauzeit 2,5 h, Einsaatdichte 1×10^3 Zellen/Well, Normierung auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, 0 nM). Dargestellt sind $MW \pm SD$ ($n=4$), $p \leq 0,05 = *$ zur Kontrolle (0 nM, 0 Gy)

In diesem Ansatz war erneut zu beobachten, dass die Zugabe von Panitumumab in einer signifikant verringerten BrdU-Einlagerung resultiert. Der Effekt war weniger stark ausgeprägt als im Vorversuch (Abb. 14) und zusätzlich lag nur unter der Zugabe von 50 nM Panitumumab eine Signifikanz vor. Die BrdU-Inkorporation nahm mit zunehmender Konzentration an Panitumumab stärker ab. Der Unterschied vom bestrahlten zum nicht-bestrahlten Ansatz betrug durchschnittlich 2,5%, war nicht signifikant und war unabhängig von der Konzentration an Panitumumab.

In der folgenden Abb. 17 wurde die BrdU-Einbauzeit auf 24 h verlängert, wodurch sich gleichzeitig die Inkubationszeit mit Panitumumab auf 72 h ausdehnte.

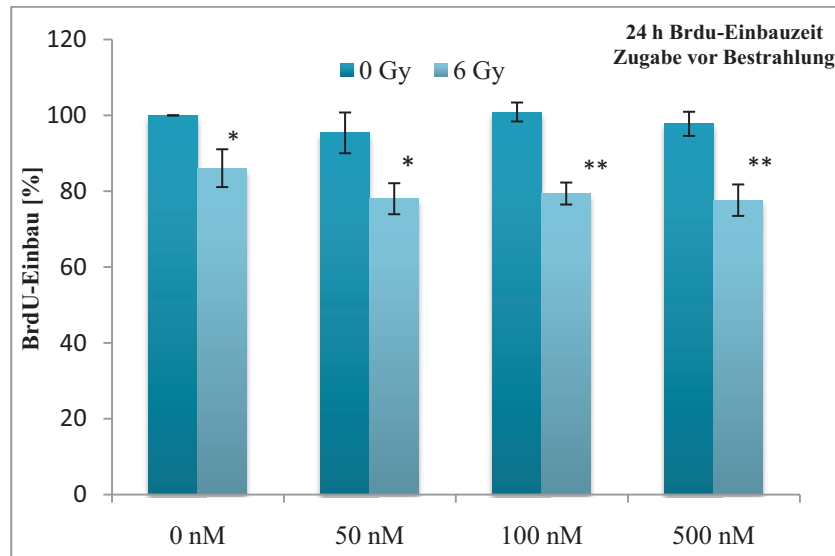


Abb. 17: BrdU- Einbau in A549-Zellen in Abhängigkeit von einer 72-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab und 6 Gy Bestrahlung. BrdU-Einbauzeit 24 h, Einsaatdichte 1×10^3 Zellen/Well, Normierung auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, 0 nM)= 100%. Dargestellt sind $MW \pm SD$ ($n=4$), $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$ zur Kontrolle (0 nM, 0 Gy) und dem jeweils nicht bestrahltem Ansatz

Durch die Verlängerung der BrdU-Inkorporationszeit von 2,5 h auf 24 h konnte ein deutlicher Bestrahlungseffekt nachgewiesen werden (vgl. Abb. 17), der im Durchschnitt für alle vier Ansätze 18% betrug und in allen Ansätzen signifikant war. In Anwesenheit von Panitumumab war dieser Effekt der Bestrahlung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (0 nM) etwas stärker ausgeprägt (21,5% bei 100 nM, 20,1% bei 500 nM), was für eine strahlensensibilisierende Wirkung von Panitumumab spräche, die aber keine Signifikanz aufwies. Die alleinige Wirkung von Panitumumab konnte nicht nachgewiesen werden.

Um lediglich die Effekte nach der Bestrahlung zu erfassen, wurde das BrdU in einem weiteren Ansatz erst nach der Bestrahlung hinzugeben. Dies zeigt die Abb. 18.

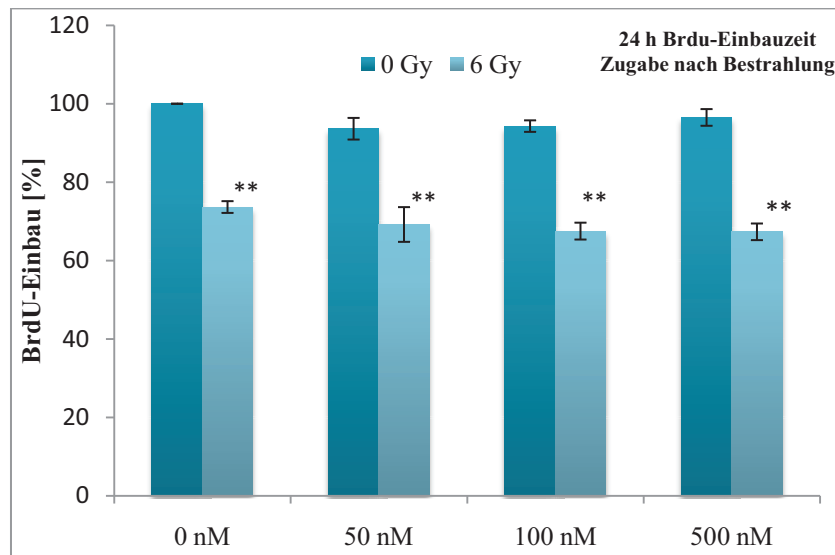


Abb. 18: BrdU-Einbau in A549-Zellen in Abhängigkeit von einer 72-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab und 6 Gy Bestrahlung. BrdU-Einbauzeit 24 h, Einsaatdichte 1×10^3 Zellen/Well, Normierung auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, 0 nM)=100%. Dargestellt sind $MW \pm SD$ ($n=4$). $p \leq 0,01 = **$ zur Kontrolle (0 Gy, 0 nM) und dem jeweils nicht bestrahltem Ansatz

Durch die BrdU- Zugabe nach der Bestrahlung waren prinzipiell die gleichen Beobachtungen zu machen wie im Vorversuch. Der Effekt der Bestrahlung war hingegen deutlicher ausgeprägt. Im Durchschnitt wurde in den bestrahlten Zellen 26,7% weniger BrdU eingelagert, als in der unbestrahlten Kontrolle.

Durch Panitumumab (50 nM - 500 nM) wurde der BrdU-Einbau in den bestrahlten sowie in den unbestrahlten Ansätzen unabhängig von der Wirkstoff-Konzentration signifikant (außer 50 nM, 6 Gy) um durchschnittlich 5% gesenkt.

3.3.2.2 BrdU-Einbau in den HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab und ionisierender Strahlung

Die Bestrahlungsversuche, die in 3.3.2.1 für die A549-Zellen beschrieben worden sind, wurden auch mit den HT-29-Zellen durchgeführt. Die Abb. 19 gibt die Ergebnisse des BrdU-Einbaus nach der Einlagerungszeit von 2,5 h wieder.

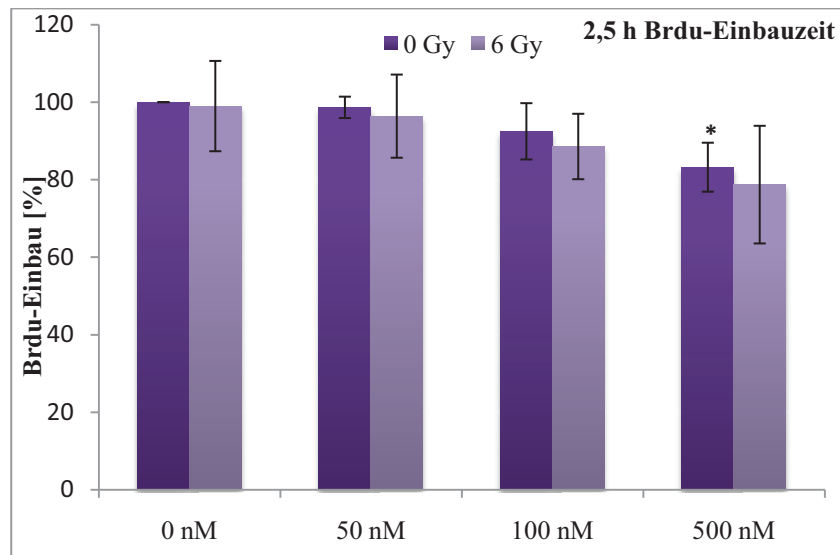


Abb. 19: BrdU- Einbau in HT-29-Zellen in Abhängigkeit von einer 48-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab und 6 Gy Bestrahlung. BrdU-Einbauzeit 2,5 h. Einsaatdichte 1×10^3 Zellen/Well, Normierung auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, 0 nM). Dargestellt sind $MW \pm SD$ ($n=4$), $p \leq 0,05 = *$ zur Kontrolle (0 Gy, 0 nM)

In den HT-29-Zellen konnte mit steigender Konzentration an Panitumumab eine abnehmende BrdU-Einlagerung beobachtet werden. Bei 500 nM war der Effekt signifikant und am größten, so dass der Einbau des BrdUs um 16% verringert wurde. Dies bestätigt die Ergebnisse der Abb. 15 im Versuchsteil ohne Bestrahlung

Hinsichtlich der Bestrahlung konnte tendenziell eine Reduzierung des BrdU-Einbaus um durchschnittlich 3% beobachtet werden. Dieser Effekt war mit zunehmender Konzentration an Panitumumab etwas stärker ausgeprägt.

Abb. 20 und Abb. 21 zeigen die Ergebnisse für die BrdU- Einbauzeit von 24 h.

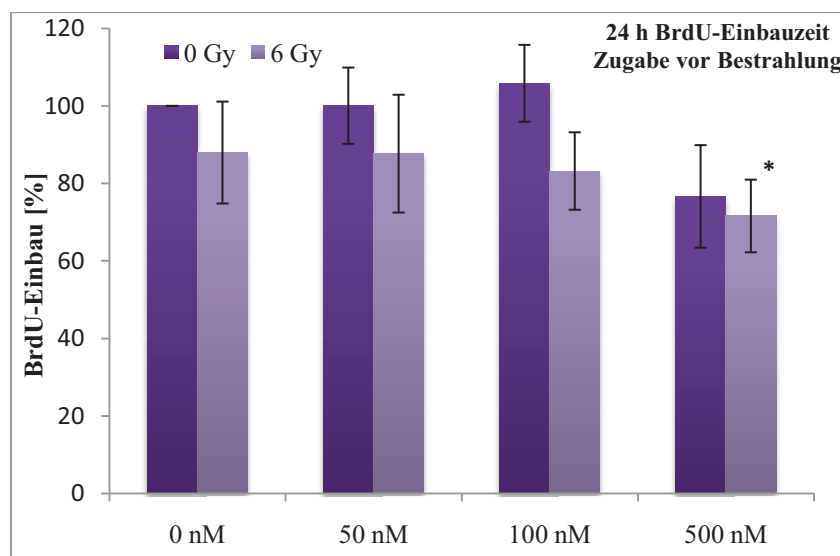


Abb. 20: BrdU- Einbau in HT-29-Zellen in Abhängigkeit von einer 72-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab und 6 Gy Bestrahlung. BrdU-Einbauzeit 24 h, Einsaatdichte 1×10^3 Zellen/Well, Normierung auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, 0 nM). Dargestellt sind $MW \pm SD$ ($n=3$). $p \leq 0,05 = *$ zur Kontrolle (0 nM, 0 Gy)

In diesem Ansatz war ebenfalls ein Bestrahlungseffekt auf die Zellproliferation zu beobachten, der jedoch nicht so stark ausgeprägt war wie bei den A549-Zellen und ebenfalls nur im Ansatz mit 100 nM Panitumumab eine Signifikanz aufwies. Der BrdU-Einbau war durch die Bestrahlung durchschnittlich um 12% (0 nM - 100 nM) verringert. Eine Ausnahme bildeten die Ansätze unter Einfluss von 500 nM Panitumumab, in denen nur ein sehr geringer Effekt durch die Bestrahlung von 5% zu beobachten war, jedoch die BrdU-Einlagerung um 25% in Abhängigkeit von Panitumumab im Vergleich zur Kontrolle (0 nM, 0 Gy) gesenkt wurde. Die Ergebnisse sind etwas kritisch zu betrachten, da Unterschiede der verschiedenen Ansätze z. T. im Bereich der einfachen Standardabweichung lagen.

In Abb. 21 wurde das BrdU nach der Bestrahlung für eine Einbauzeit von 24 h hinzugegeben.

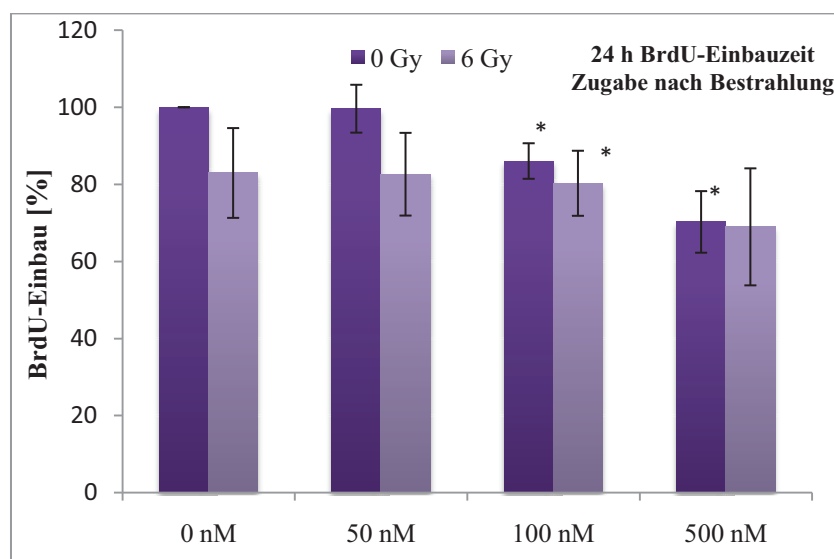


Abb. 21: BrdU- Einbau in HT-29-Zellen in Abhängigkeit von einer 72-stündigen Inkubationszeit mit Panitumumab und 6 Gy Bestrahlung. BrdU-Einbauzeit 24 h, Einsaatdichte 1×10^3 Zellen/Well, Normierung auf die unbehandelte Kontrolle (0 Gy, 0 nM). Dargestellt sind $MW \pm SD$ ($n=4$) $p \leq 0,05 = *$ zur Kontrolle (0 nM, 0 Gy)

Bei der Erfassung der Effekte nach der Bestrahlung war gut sichtbar, dass bei der Kontrolle (0 nM) und im Ansatz mit 50 nM Panitumumab die Bestrahlung der Zellen mit 6 Gy in einem erniedrigten BrdU-Einbau (um 17%) resultierte. Der Einfluss der Bestrahlung nimmt bereits bei 100 nM Panitumumab ab und ist bei 500 nM nicht mehr vorhanden, während eine Zunahme der Wirkung durch Panitumumab zu beobachten war. In den Ansätzen mit 500 nM wurde der BrdU-Einbau bis um 30% reduziert, ohne dass ein Unterschied zwischen bestrahltem und nicht bestrahltem Ansatz vorlag. Als signifikanter Unterschied ist der verminderte Einbau von BrdU bei 100 nM und 500 nM gegenüber der Kontrolle (0 Gy, 0 nM) zu betrachten.

3.4 LDH-Freisetzung - Untersuchung der Zytotoxizität von Panitumumab

Dieser Test wurde als weiteres Verfahren zur Untersuchung des Wirkspektrums von Panitumumab durchgeführt. Außerdem schien die Frage generell interessant, ob dieser Antikörper zytotoxisches Potential hat.

Die Zytotoxizität wurde mit Hilfe der Formel berechnet, die im Abschnitt 2.7 erläutert wurde, während Abb. 22 und Abb. 23 normierte Werte für die LDH-Freisetzung wiedergeben, die anhand der Extinktion berechnet wurden. Die aus den Analysen ermittelte LDH-Freisetzung der unbehandelten Zellen wurde hierbei mit dem Wert von 1 gesetzt.

In Vorversuchen wurde bei einer 24-stündigen Inkubation der A549-Zellen mit 50 nM bzw. 100 nM lediglich im Ansatz mit 100 nM ein leicht zytotoxischer Effekt von ca. 2% beobachtet. In der Kultur der HT-29-Zellen waren hingegen keine Änderungen durch die Panitumumab-Zugabe sichtbar. Daraufhin wurde die Wirkung von Panitumumab in den Konzentrationen von 100 nM bzw. 500 nM bei einer Inkubationszeit von 24 h untersucht, was in der folgenden Abb. 22 dargestellt ist.

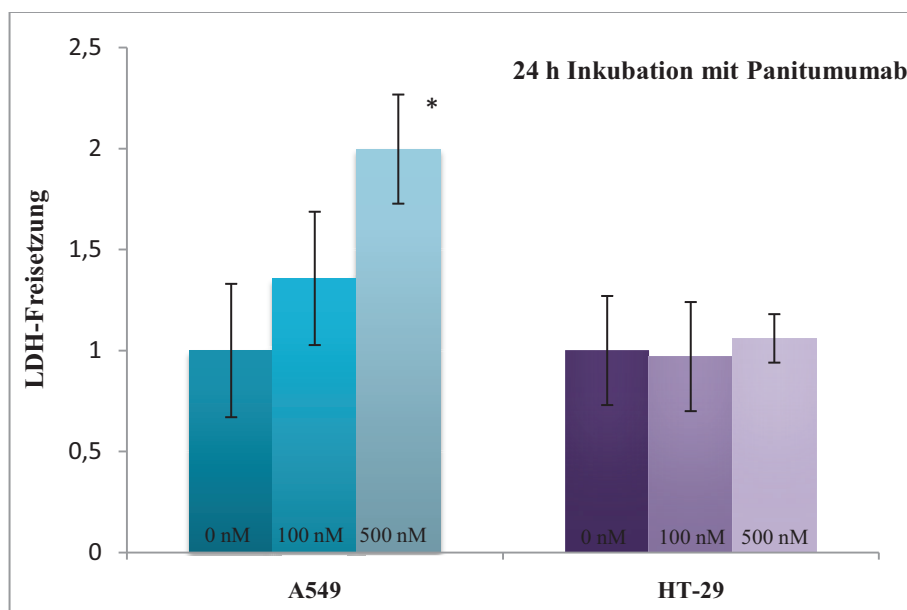


Abb. 22: LDH-Freisetzung von A549-Zellen und HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab (100 nM bzw. 500 nM). Inkubationszeit mit Panitumumab 24 h, Einsaatdichte 25×10^3 Zellen/Well, Normierung auf die Kontrolle (0 nM). Dargestellt sind $MW \pm SD$, $n=3$. $p \leq 0,05 = *$ zur Kontrolle (0 nM)

Bei den A549-Zellen war ein Anstieg der LDH-Freisetzung unter der Wirkung von Panitumumab zu erkennen. Nach Inkubation mit 500 nM hatte sich die LDH-Freisetzung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant verdoppelt (Zytotoxizität = 4%). Der Anstieg

der LDH-Freisetzung betrug bei Zugabe von 100 nM Panitumumab weniger als 50% der Kontrolle. Die berechnete Zytotoxizität betrug 1%. Der Unterschied war nicht signifikant.

Bei den HT-29-Zellen war keine Wirkung auf die LDH-Freisetzung unter der Zugabe von Panitumumab sichtbar wodurch keine Zytotoxizität berechnet werden konnte.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde die Inkubationszeit der Zellen mit Panitumumab von 24 h auf 48 h verlängert. Um weiterhin ein exponentielles Wachstum, der nun für 72 h in Kultur befindlichen Zellen zu gewährleisten, wurde die Zelldichte auf 1×10^4 Zellen/Well verringert. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 dargestellt.

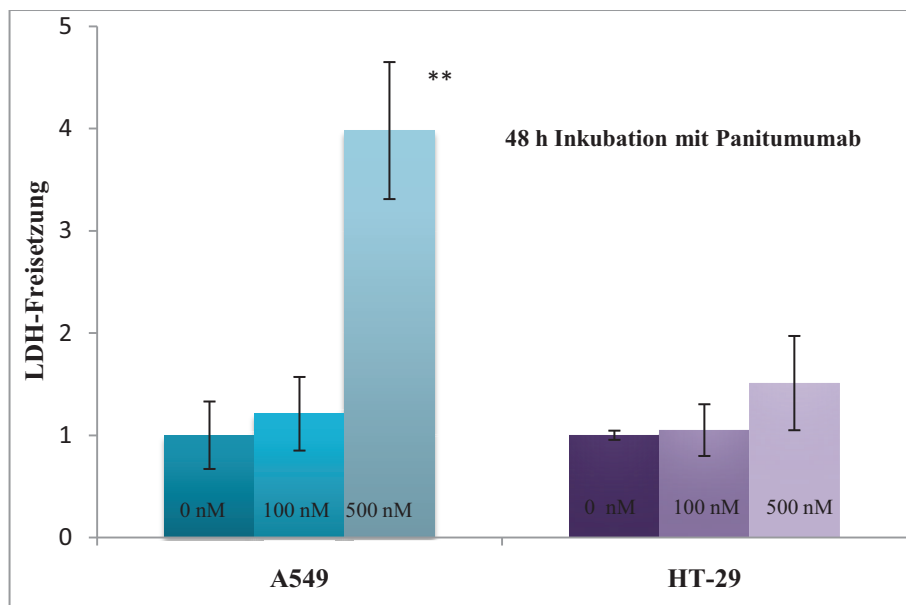


Abb. 23: LDH-Freisetzung von A549-Zellen und HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab (100 nM bzw. 500 nM). Inkubationszeit mit Panitumumab 48 h. Einsaatdichte 1×10^4 Zellen/Well. Normierung auf die Kontrolle (0 nM). Dargestellt sind $MW \pm SD$ ($n=4$). $p \leq 0,01 = **$ zur Kontrolle (0 nM, 0 Gy)

Die LDH-Freisetzung aus den A549-Zellen fiel in diesem Ansatz für die Konzentration von 500 nM Panitumumab größer als im Ansatz mit 24-stündiger Inkubationszeit aus. Relativ zur Kontrolle, hatte sich die LDH-Freisetzung unter Einfluss von 500 nM Panitumumab vervierfacht, während bei der Zugabe von 100 nM Panitumumab kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (0 nM) vorhanden war.

Die Berechnung der Zytotoxizität ergab für die Verwendung von Panitumumab in der Konzentration von 500 nM 10,8%. Bei 100 nM war in diesem Versuchsaufbau kein zytotoxischer Effekt nachweisbar.

Bei den HT-29-Zellen war ab einer Konzentration von 500 nM (Abb. 23) ein sichtbarer Anstieg der LDH-Freisetzung zu beobachten, der im Vergleich zu den A549-Zellen aber deutlich kleiner war (ca. 1/6) und keine Signifikanz aufwies. Die berechnete Zytotoxizität lag für 500 nM bei 2,3%.

3.5 Koloniebildungstests

Koloniebildungstests sind eine geeignete Langzeitmethode, um die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzelllinien zu untersuchen. Durch die zusätzliche Gabe des monoklonalen Antikörpers Panitumumab sollte untersucht werden, ob sich die Strahlenwirkung auf die jeweilige Zelllinie unter Einfluss dieses Antikörpers verändert. Die Beurteilung erfolgte anhand der Plating Efficiency und der daraus erstellten Zellüberlebenskurven.

Die Koloniebildungstests wurden in den T₂₅-Kulturflächen durchgeführt, in denen bei Einsaat von stets 1000 Zellen eine Zelldichte von 40 Zellen/cm² vorlag. Für die Koloniebildung ist es von Bedeutung, dass nicht zu viele Zellen eingesät werden, um die Proliferationskapazität der Zellen nicht zu beeinträchtigen.

3.5.1 Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab

Bei den A549-Zellen wurde das Zellüberleben nach der Zugabe von 50 nM bzw. 100 nM Panitumumab untersucht. Nach den ersten Versuchen wurde die Inkubationszeit bzw. die Versuchsdauer von 14 auf 12 Tage verkürzt um die Größe der Kolonien zu reduzieren und damit eine bessere Auszählung am Mikroskop zu gewährleisten. Für die Versuchsdauer von 14 Tagen ist die Plattiereffizienz (PE) der A549-Zellen in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Plattiereffizienz der A549-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab (50 nM bzw. 100 nM) und verschiedener Bestrahlungsdosen (0 Gy - 8 Gy). Versuchsdauer 14 Tage (n=4)

Bestrahlungsdosis [Gy]	Plattiereffizienz [MW± SD in %]		
	0 nM Panitumumab	50 nM Panitumumab	100 nM Panitumumab
0	34,5± 3,0	33,6± 3,3	34,4± 3,1
2	30,5± 1,7	30,1± 2,0	31,4± 1,3
4	26,2± 1,4	25,8± 2,6	25,6± 2,9
6	21,3± 3,0	18,7± 4,0	17,8± 3,7
8	12,1± 2,0	9,2 ± 2,6	8,6± 2,0

Ohne Einfluss von Panitumumab und Bestrahlung (Kontrolle) waren von den 1000 eingesäten A549-Zellen 34,5% in der Lage, eine Kolonie (≥50 Zellen) zu bilden. Diese Anzahl klonogener Zellen veränderte sich bei einer Bestrahlungsdosis auf 2 Gy und 4 Gy auf 30,5% bzw. 26,2%. Beim Anstieg der Dosis von 6 Gy auf 8 Gy war ein noch deutlicherer Abfall der PE auf 21,3% bzw. 12,1% sichtbar.

Bei der Zugabe von Panitumumab war im Verhältnis zu den ohne Wirkstoff behandelten A549-Zellen eine gesteigerte Wirkung der Bestrahlung ab einer Dosis von 6 Gy zu beobachten. Bei 8 Gy war der Einfluss von Panitumumab noch größer, so dass die PE noch stärker abnahm (12,1% zu 8,6%). Die PE zeigte keinen Unterschied in Abhängigkeit der beiden verschiedenen Panitumumab-Konzentrationen. Ein zytotoxischer Effekt von Panitumumab war in diesem Versuchsansatz ebenfalls nicht zu beobachten, da unabhängig von dessen Zugabe die PEs bei 0 Gy übereinstimmten.

Die PEs lagen bei Zugabe von Panitumumab bei 6 Gy und 8 Gy in allen 4 Versuchen unter der Kontrolle. Der Einfluss war jedoch nicht signifikant.

Mit Hilfe der PE wurde eine Zellüberlebenskurve (Abb. 24) erstellt, bei der es sich um eine normierte Darstellung handelt.

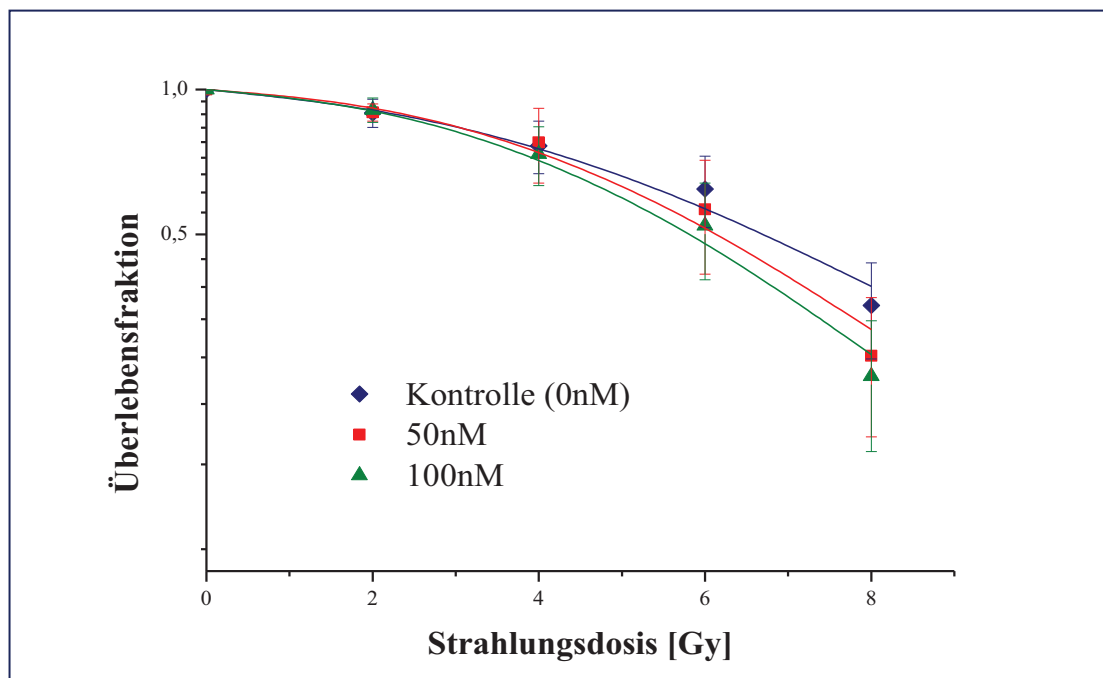


Abb. 24: Zellüberleben der A549-Zellen (40 Zellen/cm²) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (0 Gy - 8 Gy) und Panitumumab 50 nM bzw. 100 nM (Inkubation 72 h vor Bestrahlung). Versuchsdauer 14 Tage Normierung jeweils auf den Ansatz ohne Bestrahlung. Normierte MW \pm SD (n=4)

Sofern Aussagen über den Verlauf der Zellüberlebenskurve in einem Betrachtungsfeld von 0 Gy bis 8 Gy getroffen werden können, so ist die sogenannte „Schulter“ der Überlebenskurve im Bereich bis 2 Gy sichtbar und bildet bereits abgelaufene Erholungs- und Reparaturprozesse ab. Nach dem Multitarget-Modell handelt es sich im Anfangsbereich der Kurve um eine „breite Schulter“ mit einer hohen Reparaturkapazität. Der geradlinige bzw. exponentielle Teil dieser halblogarithmischen Dosis-Effekt-Kurve ist ca. ab einer Dosis von 6 Gy zu sehen.

Unter der Zugabe von Panitumumab ließen sich in einem Dosisbereich von 0 Gy bis 4 Gy keine Unterschiede zur Kontrolle nachweisen. Ab einer Dosis von 6 Gy verlief die Zellüberlebenskurve mit Panitumumab unterhalb der der Kontrolle. Dieser Effekt war bei 100 nM Panitumumab etwas stärker ausgeprägt als bei 50 nM. Bei der Bestrahlungsdosis von 8 Gy betrug das Zellüberleben der Kontrolle 0,36 und 0,25 im Ansatz mit 100 nM Panitumumab. Die Ergebnisse waren zwar nicht signifikant, dennoch lässt sich die Tendenz formulieren, dass Panitumumab im Dosisbereich von 6 Gy - 8 Gy eine strahlensensibilisierende Wirkung besaß.

Nach der Reduzierung der Versuchsdauer von 14 auf 12 Inkubationstage, wurden die folgenden PE in Abhängigkeit von Panitumumab und der Bestrahlung ermittelt, die in der Tab. 8 widergegeben werden.

Tab. 8: Plattiereffizienz der A549-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab (50 bzw. 100 nM) und verschiedener Bestrahlungsdosen (0 Gy - 8 Gy). Versuchsdauer 12 Tage (n=3)

Bestrahlungsdosis [Gy]	Plattiereffizienz [MW± SD in %]		
	0 nM Panitumumab	50 nM Panitumumab	100 nM Panitumumab
0	35,4± 1,7	29,9± 2,0	29,0± 1,2
2	30,0± 2,5	23,4± 2,1	22,9± 2,9
4	22,7± 2,7	16,0± 2,1	16,3± 4,1
6	14,0± 2,0	9,6± 0,9	8,4± 1,4
8	5,9± 2,2	3,2 ± 1,3	3,0± 1,6

Im Vergleich zum Ansatz über 14 Tage zeichnete sich die Kontrolle nach einer 12-tägigen Inkubationszeit durch einen stärkeren Abfall der PE im Dosisbereich von 6 Gy und 8 Gy aus. Bei einer Dosis von 8 Gy lag die PE nach 14 Tagen bei durchschnittlich 12,1% während sie nach 12 Tagen 5,9% betrug.

Es konnte ein zytotoxischer Effekt von Panitumumab beobachtet werden, der in einer geringeren Anzahl der Kolonien und in einer kleineren PE für alle Bestrahlungsdosen resultierte. Außer für die Bestrahlungsdosis von 6 Gy war kein signifikanter Unterschied ($p < 0,05\%$) vorhanden.

Die aus den PEs berechnete Zellüberlebenskurve ist in der folgenden Abb. 25 zu begutachten.

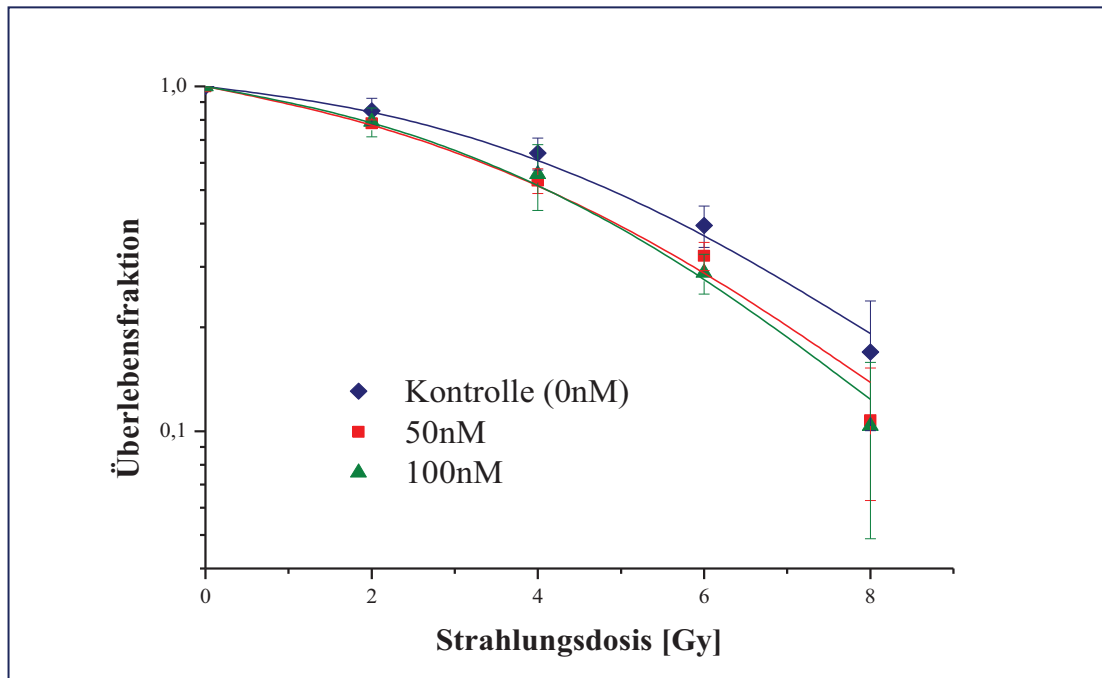


Abb. 25: Zellüberleben der A549-Zellen (40 Zellen/cm²) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (0 Gy-8 Gy) und Panitumumab 50 nM bzw. 100 nM (Inkubation 72 h vor Bestrahlung). Versuchsdauer 12 Tage. Normierung jeweils auf den Ansatz ohne Bestrahlung. Normierte MW±SD (n=3)

Die Zellüberlebenskurve bei einer Inkubationszeit von 12 Tagen verläuft etwas steiler als die bei einer Inkubationszeit von 14 Tagen. Nach dem α/β -Modell hat sich die quadratische Komponente vergrößert und die lineare Komponente (Reparaturkapazität) verkleinert. Dies ist auch an einer weniger stark ausgeprägten „Schulter“ zu erkennen.

Ab einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy ist eine Differenz zwischen der Kontrolle und dem Ansatz mit Panitumumab zu erkennen, die mit steigender Dosis zunimmt.

Ohne eine signifikante Aussage machen zu können, ließ sich in der Tendenz erkennen, dass Panitumumab auf der einen Seite Einfluss auf die Reparaturfähigkeit der A549-Zellen hatte, was in einer schmalen Schulter resultierte und zum anderen einen strahlensensibilisierenden Effekt hatte, der mit der Bestrahlungsdosis zunahm. Die Effekte waren unabhängig von der Panitumumab-Konzentration.

3.5.2 Koloniebildungsfähigkeit der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab

Bei den HT-29-Zellen wurde im Koloniebildungstest eine Konzentration von 50 nM Panitumumab eingesetzt. Insgesamt erfolgte die Inkubation für 14 Tage, bevor die Zellen fixiert und gefärbt wurden.

Die PE für die verschiedenen Bestrahlungsdosen kann der Tab. 9 entnommen werden.

Tab. 9: Plattiereffizienz der HT-29-Zellen in Abhängigkeit von 50 nM Panitumumab und verschiedener Bestrahlungsdosen (0 Gy - 8 Gy). Versuchsdauer 14 Tage (n=5)

Bestrahlungsdosis [Gy]	Plattiereffizienz [MW± SD in %]	
	0 nM Panitumumab	50 nM Panitumumab
0	45,0± 17,0	44,3± 15,6
2	40,3± 15,2	39,6± 15,0
4	34,9±16,0	33,9± 15,8
6	26,9± 12,1	26,8± 11,7
8	15,0± 8,8	14,7± 8,4

Die PE für die Kontrolle (0 Gy) lag bei 45% und war damit größer als diejenige der A549-Zellen. Der Abfall der PE im niedrigen Dosisbereich verlief zunächst langsam und nahm mit steigender Dosis zu. Durch die Zugabe von 50 nM Panitumumab konnten keine zytotoxischen Effekte beobachtet werden.

Die folgende Abb. 26 gibt das Zellüberleben der HT-29 Zellen unter Zugabe von 50 nM Panitumumab und in Abhängigkeit der Bestrahlung in normierter Form wieder.

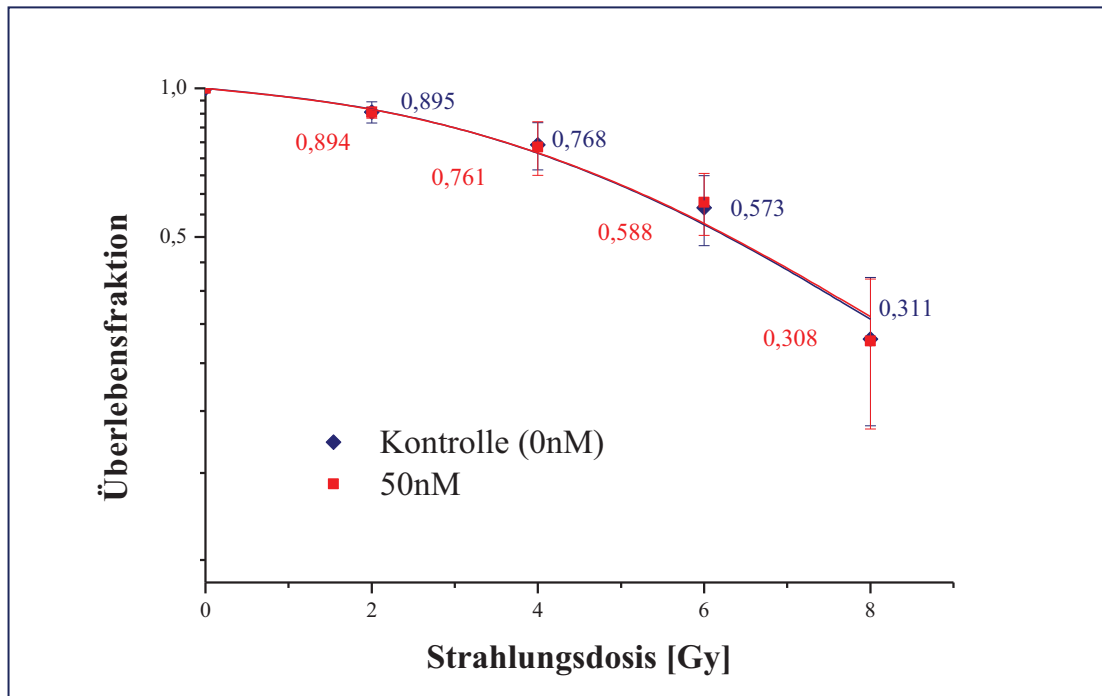


Abb. 26: Zellüberleben der HT-29-Zellen (Einsaatdichte 40 Zellen/cm²) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis (0 Gy - 8 Gy) und Panitumumab 50 nM (Inkubation 72 h vor Bestrahlung). Normierung jeweils auf den Ansatz ohne Bestrahlung. Darstellung von normierten MW±SD (n=5)

Der Verlauf der Zellüberlebenskurve der HT-29 zeigte im niedrigen Dosisbereich einen langsamen Abfall des Zellüberlebens, der geringfügig stärker ausgeprägt war, als bei den A549-Zellen. Es war ebenfalls eine breite „Schulter“ zu erkennen, die auf eine gut ausgeprägte Reparaturfähigkeit der HT-29-Zellen schließen lässt. Die exponentielle Abnahme (β -Komponente) war ab einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy zu beobachten. Bei 8 Gy betrug das Zellüberleben der unbestrahlten Kontrolle 30% und lag mit diesem Wert im gleichen Bereich der A549-Zellen.

Panitumumab hatte in diesem Versuchsansatz keinen Effekt auf die Proliferationskapazität der HT-29-Zellen. Die Zellüberlebenskurven verliefen nahezu deckungsgleich.

3.6 Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels γ -H2AX-Test

Der γ -H2AX-Test wurde durchgeführt um zu untersuchen, ob Panitumumab (in einer Konzentration von 50 nM) die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche von unbestrahlten Zellen beeinflusst. Zudem war es von Interesse, ob die Reparaturkapazität nach Schädigung der Zellen mit ionisierender Strahlung (6 Gy) durch Panitumumab beeinträchtigt wird.

3.6.1 Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen in A549-Zellen

Die folgende Abbildung gibt das fluoreszenzmikroskopischen Bild wieder, das sich durch die Präparation mit den zwei Antikörpern ergibt. Die zu zählenden roten „Foci“ sind gut zu erkennen und in ihrer Anzahl direkt proportional zu dem Vorkommen der DNA-Doppelstrangbrüchen.

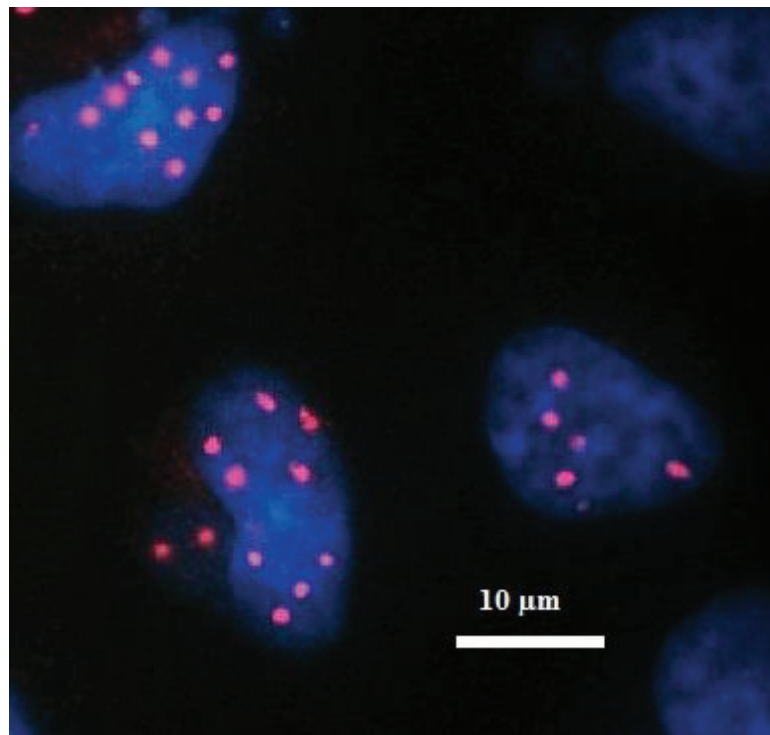


Abb. 27: „Foci“ in A549-Zellen nach der Bestrahlung mit 6 Gy und einer Reparaturzeit von 24 h. 1000-fache Vergrößerung. Die Zellkerne stellen sich durch die DAPI-Färbung blau dar, während die DNA-Doppelstrangbrüche durch die Markierung mit den zwei Antikörpern als rote „Foci“ zu erkennen sind.

Der Abb. 28 ist die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche für die verschiedenen Ansätze der A549-Zellen zu entnehmen.

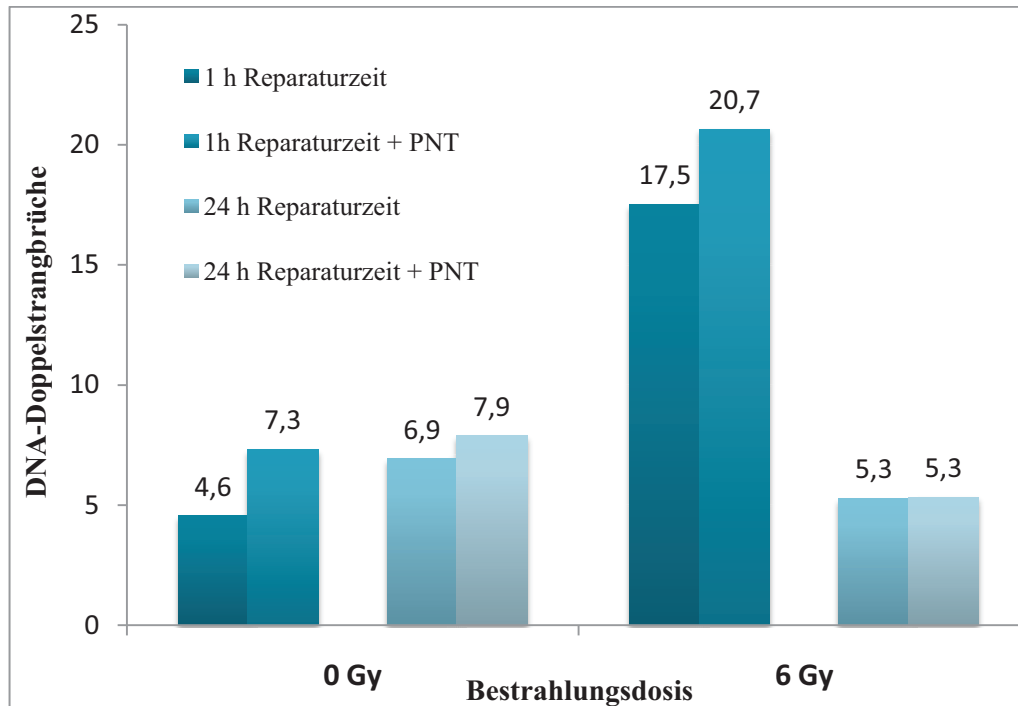


Abb. 28: Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in A549-Zellen in Abhängigkeit von 50 nM Panitumumab (PNT), 6 Gy Bestrahlung und 1 h bzw. 24 h Reparaturzeit. Einsaatdichte 25×10^3 Zellen/ml und 48-stündige Inkubationszeit mit Panitumumab vor Bestrahlung. Dargestellt sind MW (n=5)

Bei 0 Gy war das Vorkommen von durchschnittlich 5 DNA-Doppelstrangbrüchen pro Zelle in den ohne Wirkstoff behandelten A549-Zellen zu beobachten. Durch die Bestrahlung mit 6 Gy (Reparaturzeit 1 h) hat sich die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche auf 17,5 ca. verdreifacht. Sowohl in der unbestrahlten Kultur, als auch im Ansatz mit 6 Gy Bestrahlung wurde dieser Effekt durch das Vorhanden sein von Panitumumab bei einer Reparaturzeit von 1 h verstärkt, so dass im Mittel 3 DNA-Doppelstrangbrüche mehr zu beobachten waren. So stieg die Anzahl der Doppelstrangbrüche bei 0 Gy in Abhängigkeit von Panitumumab von 4,6 auf 7,3 und bei 6 Gy von 17,5 auf 20,7. Die vermehrte Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen unter Einfluss von Panitumumab konnte in jedem der vier unabhängigen Versuche nachgewiesen werden. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) für den Effekt von Panitumumab betrug im unbestrahlten Ansatz (1 h Reparaturzeit) 8% und im Versuch mit 6 Gy Bestrahlung 28%.

Im Vergleich zu dem Ansatz mit einer einstündigen Reparaturzeit, waren nach 24 h Reparaturzeit nur noch $\frac{1}{4}$ der DNA-Doppelstrangbrüche vorhanden. Durch die abgelaufene Reparatur waren in den A549-Zellen nach 24 h ungefähr wieder die gleiche Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen vorhanden wie im unbestrahlten Ansatz (4,6 Doppelstrangbrüche im

unbestrahlten Ansatz im Verhältnis zu 5,3 Doppelstrangbrüchen mit 6 Gy Bestrahlung nach 24 h Reparatur).

Panitumumab hatte in einer Konzentration von 50 nM keinen Einfluss auf die Reparaturkapazität, was nach dessen Zugabe bei einer Reparaturzeit von 24 h durch fehlende Effekte deutlich wurde.

3.6.2 Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen in HT-29-Zellen

In Abb. 29 ist die Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen in den HT-29-Zellen unter dem Einfluss von Panitumumab und Bestrahlung sowie in Abhängigkeit verschiedener Reparaturzeiten grafisch dargestellt.

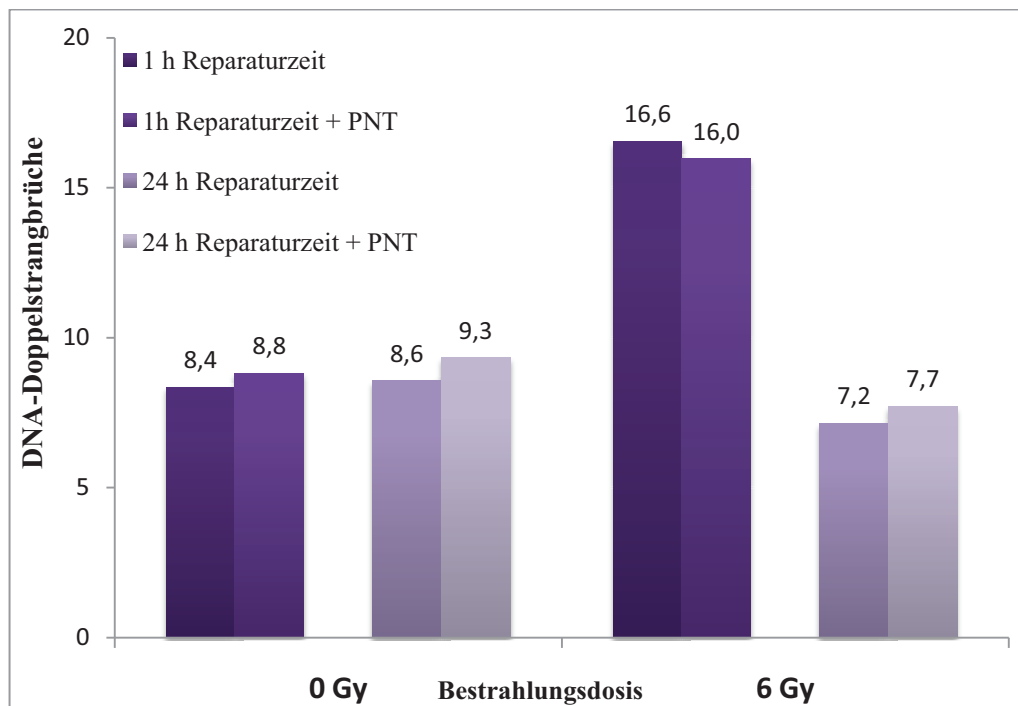


Abb. 29: Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in HT-29-Zellen in Abhängigkeit von 50 nM Panitumumab (PNT), 6 Gy Bestrahlung und 1 h bzw. 24 h Reparaturzeit. Einsaatdichte 25×10^3 Zellen/ml und 48-stündige Inkubationszeit mit Panitumumab vor Bestrahlung. Dargestellt sind MW ($n=5$)

In der Kontrolle (0 Gy) waren im Durchschnitt 8,4 DNA-Doppelstrangbrüche pro HT-29-Zelle nachweisbar. In Abhängigkeit von der Bestrahlung mit 6 Gy verdoppelte sich die Anzahl auf 16,6. Panitumumab hatte damit keinen Einfluss auf die Häufigkeit an DNA-Doppelstrangbrüchen in den HT-29-Zellen.

Nach einer Reparaturzeit von 24 h wurde deutlich, dass es zu einer vollständigen Reparatur aller DNA-Doppelstrangbrüche kam. Dabei lag bei den HT-29-Zellen die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche nach einer Reparaturzeit von 24 h geringfügig unterhalb der Anzahl in der

Kontrolle bei 0 Gy (8,4 zu 7,2 DNA-Doppelstrangbrüchen). Das Reparaturverhalten der HT-29-Zellen wurde durch Panitumumab ebenfalls nicht beeinflusst.

Die Zugabe von Panitumumab zeigte in keinem der fünf unabhängigen Versuche einen Effekt. Daher wurden wie auch bei den A549-Zellen lediglich die Mittelwerte dargestellt, da die Varianzen unter den fünf unabhängigen Versuchen größer waren, als die Unterschiede des Effekts in den verschiedenen Ansätzen.

4 Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der zytotoxischen bzw. strahlensensibilisierenden Wirkung des monoklonalen Antikörpers Panitumumab (ABX-EGF) auf die beiden humanen Tumorzelllinien A549 und HT-29, die sich durch ihren *KRAS*-Status unterscheiden.

4.1 Wachstumsversuche

4.1.1 Natives Wachstum von A549-Zellen und HT-29-Zellen

Mittels einer nativen Wachstumskurve konnte das Wachstum der Zelllinien A549 und HT-29 beurteilt werden. Dabei wurden die Zellpopulationsverdopplungszeiten mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse für den Zeitraum des exponentiellen Wachstums bestimmt. Für die A549-Zellen war eine Zellpopulationsverdopplungszeit von 20,2 h vorhanden. Mit diesem Ergebnis lag die Zellpopulationsverdopplungszeit unter dem von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) angegebenen Wert von ca. 40 h und der in BAUMGART (2008) bestimmten Zeit von 25 h. Analoge Abweichungen wurden bei den Zellpopulationsverdopplungszeiten der HT-29-Zellen beobachtet. Dabei benötigten die HT-29-Zellen zur Verdopplung ihrer Zellpopulation 19,9 h im Vergleich zu 40-60 h (DSMZ).

Ursache für die Differenzen der berechneten Zellpopulationsverdopplungszeiten können Umgebungsfaktoren wie z.B. die Zusammensetzung des Mediums sein. Ebenfalls spielt das FBS eine entscheidende Rolle, welches bei verschiedenen Chargen ein unterschiedliches Wachstum bedingen kann. Zudem können die Zellen verschiedener Passagen eine unterschiedliche Wachstumspotenz zeigen.

Die Zellpopulationsverdopplungszeit sollte in dieser Arbeit allerdings weniger dazu dienen, die unbehandelten Kontrollen zu vergleichen, als vielmehr den Einfluss von Panitumumab in der Phase des exponentiellen Wachstums (Log-Phase) auf die Zellen zu untersuchen.

4.1.2 Wachstum der A549-Zellen und HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab

Bei den A549-Zellen konnte Panitumumab das Wachstum verlangsamen. Diese Wachstumshemmung war konzentrationsunabhängig. Nach der Inkubationszeit von fünf Tagen war die Zellzahl um ca. 40% geringer als die der Kontrolle (0 nM). Die

Zellpopulationsverdopplungszeit wurde durch die Inkubation mit 50 nM - 5 μ M Panitumumab von 20 h auf 24 h verlängert. Typisch für einen monoklonalen Antikörper ist der Verlauf der Wachstumskurve, der einen nicht konzentrationsabhängigen, aber zeitabhängigen Effekt zeigt, wie es bereits für den EGFR-Antagonisten Cetuximab in *In-vitro*-Versuchen für Zelllinien von Kopf-Hals Tumoren beschrieben worden ist (HUANG *et al.*, 1999). Hier konnte das Zellwachstum unter Einfluss von 30 nM Cetuximab in verschiedenen Zelllinien um 20-75% gedrosselt werden. Unter der Konzentration von 25 nM hatte die Wirkung von Panitumumab auf die Zellpopulation eine abnehmende Tendenz, obwohl auch bei 1 nM noch signifikante Unterschiede zur Kontrolle vorhanden waren. Die minimale Konzentration an Panitumumab, die nötig ist um noch sichtbare Effekte auszulösen, konnte somit nicht ermittelt werden. Des Weiteren konnte auch ein so genannter IC₅₀-Wert nicht errechnet werden, da die Zellpopulation nur bis auf maximal 60% im Vergleich zur Kontrolle (0 nM) gesenkt wurde.

Allein durch die in den Wachstumskurven ermittelten Zellzahlen lässt sich nicht feststellen, ob der Einfluss von Panitumumab lediglich auf eine Beeinträchtigung der Zellproliferation zurückzuführen ist, oder ob auch die durch EGFR regulierten Mechanismen wie Apoptose und Zellüberleben eine Rolle spielen. Hier könnte die sogenannte Zählung von „Apoptotic Bodies“ oder die Untersuchung des Caspase 3/7 Levels (DI NICOLANTONIO *et al.*, 2008) weiterführende Ergebnisse liefern.

Bei der Zählung mit dem Beckmann Counter-Coulter kann die Zellgröße eingestellt werden, nicht jedoch zwischen vitalen und nicht vitalen Zellen unterschieden werden. Das bedeutet, dass unter Umständen auch tote Zellen gezählt werden. Zur Unterscheidung von toten und lebenden Zellen wäre die Färbung mit Trypanblau und die Zählung in der Neubauerzählkammer eine Möglichkeit, um die Ergebnisse weiter zu differenzieren.

Entgegen den Erwartungen war bei den HT-29-Zellen keine Wirkung von Panitumumab auf das Zellwachstum zu beobachten, obwohl es sich laut Literatur bei dieser Zelllinie um einen *KRAS*-Wildtyp handelt (DI NICOLANTONIO *et al.*, 2008). Auch in GIANNOPOULOU'S Versuchen (2009) konnte die Proliferation der HT-29-Zellen nicht durch Panitumumab beeinflusst werden. Gleiches galt für eine weitere Zelllinie (Caco-2), die ebenfalls keine *KRAS*-Mutation besitzt und aus einem kolorektalen Karzinom stammt.

Interessant hingegen war der deutliche Effekt von Panitumumab auf die A549-Zellen, da in Zelllinien mit einer *KRAS*-Mutation (TOULANY *et al.*, 2006) normalerweise eine intrinsische Daueraktivierung besteht und die Zellen damit resistent gegenüber der Regulation am EGF-Rezeptor sind (s.1.3.3.). Ausnahmen werden aber bereits diskutiert. Aufgrund einer spezifischen Mutation in 1% der *KRAS*-Mutanten soll weiterhin die Abhängigkeit gegenüber einer

Antikörpertherapie am EGFR bestehen (BARDELLI & SIENA, 2010). Laut den Wachstumsversuchen der A549-Zellen in dieser Arbeit ist eine Abhängigkeit vom EGF-Rezeptor noch in dem Maß vorhanden, dass das Zellwachstum mit Panitumumab um 40% des Ausgangswertes gemindert werden konnte.

4.1.3 Wachstum der A549-Zellen und HT-29-Zellen unter Einfluss von Sorafenib (BAY 43-9006)

Eine mögliche Erklärung für die Resistenz der HT-29-Zellen gegenüber Panitumumab in den Wachstumskurven könnte die Mutation *BRAF V600E* (auch *V599E*) sein, die in 12 % der Kolorektalen Karzinome vorhanden ist (PRATILAS & SOLIT, 2007). Die Punktmutation wird für die HT-29-Zellen beschrieben und geht mit einer erhöhten Kinaseaktivität und der Aktivierung des MAP-Kinase-Weges im Vergleich zum Wildtyp einher. Daraus ergibt sich die hochgradige Refraktärität der HT-29-Zellen gegenüber Panitumumab am EGF-Rezeptor, die durch *In-vitro*-Untersuchungen bestätigt worden ist (DI NICOLANTONIA *et al.*, 2008).

Als potenter Inhibitor der *BRAF*-Kinase wird Sorafenib (BAY 43-9006) beschrieben, das in einem Versuchsansatz von DI NICOLANTONIO in der Kombination von Panitumumab und Sorafenib erprobt wurde, um über die Hemmung der *BRAF*-Kinase eine Sensitivierung des EGF-Rezeptors gegenüber Panitumumab zu erreichen. Dieser synergistische Effekt konnte in den Versuchen von DI NICOLANTONIO nachgewiesen werden.

Auch in der vorliegenden Arbeit sollte mittels der Sorafenib-Gabe somit indirekt geklärt werden, ob in den verwendeten HT-29-Zellen eine *BRAF*-Mutation *V600E* vorliegt und deshalb Panitumumab das Wachstum dieser Zellen nicht inhibiert. Sorafenib konnte in den Versuchen dieser Arbeit in einer Konzentration von 4 µM weder allein noch in Kombination mit Panitumumab eine Wirkung zeigen, weshalb die Diskussion über die Resistenz der HT-29 Zellen gegenüber Panitumumab weiterhin nicht abschließend geklärt werden kann. Eine erneute Genanalyse zur Bestätigung der Mutation *BRAF* könnte hilfreich sein, obwohl damit auch die fehlende Wirkung von Sorafenib allein in den HT-29-Zellen nicht geklärt ist, die in Versuchen von WILHELM *et al.* (2004) ausführlich dargelegt worden ist.

Nach Aussagen von PRATILAS & SOLIT entspricht das Ergebnis den Erwartungen, da der alleinige wachstumshemmende Effekt durch Sorafenib in *BRAF*-Mutanten (HT-29-Zellen) nur in solch hohen Dosen erreicht wird, dass nicht von einer effektiven Hemmung gesprochen werden kann. Zusätzlich darf nicht vergessen werden, dass auch andere Signalwege von Mutationen betroffen sein können.

In den A549-Zellen wurde unter der Zugabe von 4 μ M Sorafenib am 5. Tag ein signifikanter Unterschied im Zellwachstum von 10% beobachtet, der auch am 6. Tag in nicht signifikanter Ausprägung vorhanden war. Dies bestätigt die These von WILHELM *et al.*, dass die *KRAS*-Mutation von NSCLC-Zelllinien nur bedingt sensitiv für die Inhibition des proliferationsaktivierenden MAP-Kinase-Weges durch Sorafenib sind. Über andere Signalwege können aber möglicherweise noch weitere hemmende Effekte hervorgerufen werden. Da Sorafenib nicht den EGF-Rezeptor besetzen soll, bleibt die Abnahme des wachstumsverzögernden Effektes bei der Kombination von Panitumumab und Sorafenib im Vergleich zur alleinigen Gabe von Panitumumab diskutabel.

4.2 Metabolische Aktivität der A549-Zellen und HT-29-Zellen

4.2.1 Metabolische Aktivität unter Einfluss von Panitumumab

Der EZ4U-Test, der vom Hersteller auch als ein nicht radioaktiver Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest bezeichnet wird, wurde zur Untersuchung der metabolischen Aktivität der A549-Zellen und der HT-29-Zellen verwendet. Dabei konnte in den A549-Zellen keine Wirkung beobachtet werden, während in den HT-29-Zellen eine tendenzielle Reduzierung der metabolischen Aktivität um 10% in Abhängigkeit von Panitumumab gegenüber der unbehandelten Kontrolle vorhanden war.

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsversuche mit den A549-Zellen und der Analysen mit dem chimären monoklonalen Antikörper Cetuximab von JANMAAT *et al.* (2003) wäre ein Effekt zu erwarten gewesen. Mittels eines MTT-Ansatzes konnte unter Einfluss von Cetuximab das Wachstum der A549-Zellen um 49% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gesenkt werden. Bei genauerer Betrachtung des dargestellten Versuchsaufbaus war festzustellen, dass die Inkubationszeit mit Panitumumab zwischen den eigenen Versuchen und denen von JANMAAT variierte. Die Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst für 24 h und in den Bestrahlungsversuchen (4.2.2) für 48 h mit Panitumumab vorbehandelt. In den beschriebenen Versuchen mit C225 betrug die Inkubationszeit 72 h, was bei Betrachtung der Wachstumskurven sinnvoll erscheint und erklären könnte, warum es in den Versuchen dieser Arbeit mit Panitumumab zu keiner Änderung der metabolischen Aktivität kam. Die Inkubation der Zellen für 72 h mit Panitumumab wäre somit eine weitere Option, um die Wirkung von Panitumumab auf die metabolische Aktivität der A549- und HT-29-Zellen zu untersuchen.

Zudem war die Einsaatdichte im Versuchsaufbau nicht optimal gewählt, da nach 24 h die Extinktionswerte nach Abzug des Leerwertes recht gering waren. Dies bedeutet, dass kleine Änderung in der Extinktion, viel größere Unterschiede in der prozentual berechneten „Metabolischen Aktivität“ widerspiegeln, was bei den HT-29- Zellen der Grund für den nicht signifikanten Effekt sein könnte. Die Erhöhung der Einsaatdichte von 1×10^3 Zellen/Well auf 1×10^4 Zellen/Well wäre für weitere Versuche zu empfehlen, wobei die Zellen aber weiterhin in ihrer exponentiellen Wachstumsphase bleiben sollten.

4.2.2 Metabolische Aktivität unter Einfluss von Panitumumab und Bestrahlung

Wie beschrieben war auch unter dem 48-stündigen Einfluss von Panitumumab kein Effekt auf die metabolische Aktivität in den A549-Zellen zu beobachten. Hinsichtlich der HT-29-Zellen konnte für die nicht bestrahlten Kontrollen die Tendenz einer Erniedrigung der Metabolischen Aktivität durch Panitumumab im Vergleich zum Ansatz mit der 24-stündigen Vorbehandlung reproduziert werden. Des Weiteren konnte bei der Analyse der metabolischen Aktivität der A549-Zellen 30 min nach der Bestrahlung (Inkubationszeit mit der Testsubstanz XTT für 2,5 h) kein Bestrahlungseffekt beobachtet werden. Möglicherweise war der Zellmetabolismus nach dieser Zeitspanne (30 min) noch nicht in der Weise beeinträchtigt, als dass es in sichtbaren Änderungen der metabolischen Aktivität resultierte. Es wäre daher interessant den Zeitpunkt der Zugabe der Testsubstanz zu verändern (z.B. 24 h nach der Bestrahlung), um so die Veränderung der metabolischen Aktivität an einem späteren Zeitpunkt nach der Bestrahlung zu untersuchen. Bei den HT-29-Zellen war durch die Bestrahlung die metabolische Aktivität der Kontrolle (0 nM) um durchschnittlich 14% gestiegen. Diese strahlungsassoziierte Steigerung der metabolischen Aktivität erscheint zunächst etwas ungewöhnlich, könnte aber durch eine Zellaktivierung aufgrund der Zellschädigung nach der Bestrahlung erklärt werden. Zum Vergleich erscheint es auch hier sinnvoll, den Effekt der Bestrahlung nach einer längeren Inkubationszeit mit Panitumumab (z.B. 72 h) zu einem späteren Zeitpunkt nach der Bestrahlung zu untersuchen.

4.3 Untersuchung der Zellproliferation der A549 und der HT-29-Zellen mittels BrdU-Test

Die Grundlage des BrdU-Tests ist der Einbau eines nicht-radioaktiven Thyminanalogs in die DNA der Zellen. Voraussetzung ist dementsprechend, dass sich die Zellen in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Die am Ende gemessene Extinktion ist zum Einen abhängig von der absoluten Zellzahl und zum anderen bedingt durch den Anteil proliferierender Zellen. Im Gegensatz zu den Wachstumsversuchen können mit dem BrdU-Test Substanzen detektiert werden, die den Zellzyklus direkt negativ beeinflussen, was dann in einer verminderten Zellproliferation resultiert.

4.3.1 Zellproliferation unter Einfluss von Panitumumab

Der BrdU-Einbau wurde nach einer Inkubationszeit der A549-Zellen für 48 h mit Panitumumab (500 nM) bis auf 62% im Vergleich zur Kontrolle (100%) reduziert. Weniger stark war der Effekt bei 50 nM bzw. 100 nM Panitumumab (78% und 74%) ausgeprägt, was für einen dosisabhängigen Effekt spräche, der in den Wachstumskurven in diesem Dosisbereich nicht beobachtet werden konnte. Durch Panitumumab werden die Zellen in einen G₁-Arrest versetzt (JANMAAT & GIACCONE, 2003), was den prozentualen Anteil der Zellpopulation in der S-Phase verringert und so in einem verminderten Einbau von BrdU resultiert. Dies konnte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit mit den A549-Zellen nachgewiesen werden und bestätigte die Resultate der Wachstumsversuche in ihrer Aussage, dass Panitumumab einen hemmenden Effekt auf die Proliferation der A549-Zellen hat.

Bei den HT-29-Zellen war im Unterschied zu den Wachstumskurven eine proliferationshemmende Tendenz mittels BrdU-Test sichtbar. Der BrdU-Einbau konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100%) um 33% reduziert werden und deutet damit ebenfalls einen G₁-Arrest der HT-29-Zellen an. Aufgrund der großen Standardabweichung bleibt offen, ob die Mittelwerte tatsächlich einen Effekt widerspiegeln und ob es durch Panitumumab möglich ist, die S-Phase des Zellzyklus zu beeinträchtigen ohne dabei sichtbare Auswirkungen auf die Zellzahl der HT-29-Zellen (Wachstumskurven) zu haben. Eine Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometer könnte hierbei genauere Aussagen über den Einfluss von Panitumumab auf die einzelnen Zellzyklusphasen liefern und das Ergebnis des BrdU-Tests mit Hilfe dieser anderen Methode bestätigen.

Um ein exponentielles Wachstum über die drei Wachstumstage zu gewährleisten, wurden in Vorversuchen Einsaatdichten von 1×10^3 Zellen/Well und 5×10^3 Zellen/Well getestet und die

kleinere Dichte gewählt. Daraus ergaben sich niedrigere Extinktionswerte, die bei kleineren Differenzen zwischen den verschiedenen Ansätzen in größeren Unterschieden in dem prozentualen BrdU-Einbau resultierten. Dies war besonders bei den HT-29-Zellen zu beobachten. In weiteren Versuchen wäre eine erhöhte Einsaatdichte empfehlenswert.

4.3.2 Zellproliferation unter Einfluss von Panitumumab und Bestrahlung

Bei den Bestrahlungsversuchen entsprach der Aufbau zunächst prinzipiell demjenigen, der in 4.3.1. diskutiert wurde. Die BrdU-Einlagerungszeit betrug ebenfalls 2,5 h und die Vorbehandlung mit Panitumumab (500 nM) 48 h. Trotzdem wurde der BrdU-Einbau in der unbestrahlten Kontrolle nur um 21% (statt um 38%, vergl. 4.3.1) gesenkt. Durch den Prozess der Bestrahlung wurden die Zellen zusätzlichem Stress ausgesetzt, indem für den Zeitraum der Bestrahlung (ca. 45 min) nicht ihre optimalen Kultivierungsbedingungen (37°C, 5% CO₂) vorlagen. Dies könnte die S-Phase des Zellzyklus in allen Ansätzen beeinflusst haben, so dass sich der Effekt von Panitumumab weniger stark herauskristallisieren konnte.

Bei den HT-29-Zellen wurde die Wirkung durch Panitumumab ab einer Konzentration von 100 nM aus dem Vorversuch bestätigt und die BrdU-Einlagerung bei 500 nM im Vergleich zur Kontrolle (0 nM) signifikant um 16% gesenkt.

Weder in den A549-Zellen, noch in den HT-29-Zellen waren bestrahlungsassoziierte Differenzen bei einer BrdU-Inkorporationszeit von 2,5 h zu beobachten. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass die BrdU-Einbauzeit möglicherweise zu kurz bemessen war bzw. der prozentuale Anteil der S-Phase Fraktion der Zellpopulation noch nicht durch die Bestrahlung beeinträchtigt war. Durch die ionisierende Strahlung verlagert sich der Anteil der Zellpopulation zunehmend in die G₁-Phase und die G₂/M-Phase, wohingegen die S-Phase-Fraktion kleiner wird. Es wird angenommen, dass das Minimum des Anteils der S-Phase-Fraktion bei einer Bestrahlungsdosis von über 4 Gy zwischen 16 h - 48 h nach der Bestrahlung erreicht ist (DI LEONARDO *et al.*, 1994). Aus diesem Grunde wurde der Versuchsaufbau variiert.

Nach der Verlängerung der BrdU-Einbauzeit auf 24 h war ein deutlicher Bestrahlungseffekt bei einer Dosis von 6 Gy in den A549-Zellen nachweisbar. Der verringerte BrdU-Einbau nach der Bestrahlung um durchschnittlich 18% war damit kennzeichnend für die Verkleinerung der S-Phase-Fraktion. Durch die BrdU-Zugabe nach der Bestrahlung konnte die beschriebene Wirkung noch verstärkt werden und der BrdU-Einbau wurde um 27% gesenkt. Dies zeigte, dass der Effekt der ionisierenden Strahlung auf die Zellproliferation möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt (nach der Bestrahlung) noch ausgeprägter ist.

Panitumumab hatte trotz der Inkubationszeit von 72 h, nur eine geringe nicht signifikante Abnahme des BrdU-Einbaus von ca. 5% in den A549-Zellen zur Folge. Durch den deutlich stärkeren und konkurrierenden Einfluss der Bestrahlung auf die Zellzyklusfraktionen scheint die G₁-Verlagerung durch Panitumumab eine nur untergeordnete Rolle zu spielen. Kombinierte Effekte konnten mittels BrdU nicht nachgewiesen werden.

Bei den HT-29-Zellen war auffällig, dass mit Ausnahme des Ansatzes mit 500 nM Panitumumab ein Bestrahlungseffekt von durchschnittlich 12% auftrat, während bei der Konzentration von 500 nM Panitumumab fast kein Unterschied durch die Bestrahlung (0 Gy im Vergleich zu 6 Gy) zu beobachten war. Trotzdem wurde in beiden Ansätzen mit 500 nM Panitumumab der BrdU-Einbau um 25% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 Gy, 0 nM) gesenkt.

Bei der Zugabe des BrdUs nach der Bestrahlung war schon bei 100 nM Panitumumab der Effekt der Bestrahlung weniger ausgeprägt als bei 50 nM. Im Versuch mit 500 nM gab es wiederum keinen Unterschied vom bestrahlten zum unbestrahlten Ansatz. Dies gab Anlass zur Vermutung, dass sowohl Panitumumab als auch die Bestrahlung eine gleichrichtende reduzierende Wirkung auf die Zellen der S-Phase Fraktion des Zellzyklus hatten, die sich nicht addierten. Ab 500 nM überwiegte möglicherweise die Wirkung von Panitumumab mit einer Verlagerung der Zellen in die G₁-Phase. Die Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometer stellt auch hier ein weiterführendes Verfahren dar, um die Kombination aus Bestrahlung und Panitumumab genauer zu untersuchen.

4.4 LDH-Freisetzung aus den A549-Zellen und HT-29-Zellen

Mittels der LDH-Freisetzung wurde in den Versuchen mit Panitumumab untersucht, ob unter dessen Einfluss die Membrandurchlässigkeit der Zellen verändert wird. Die Durchlässigkeit von Zellmembranen kann durch direkte Membranschädigungen erhöht werden oder sekundär über zytotoxische Effekte hervorgerufen werden. Ab einer Panitumumab-Konzentration von 500 nM konnte in den A549-Zellen bei einer Inkubationszeit von 24 h eine Zytotoxizität von 4% ermittelt werden, die sich durch eine verlängerte Inkubationszeit von 48 h noch auf 10,8% vergrößerte. Bei den HT-29-Zellen lag nach einer Inkubationszeit mit Panitumumab über 48 h eine Zytotoxizität von 2,3% vor.

Für einen monoklonalen Antikörper ist aufgrund seines selektiven Angriffs ein zytotoxisches Potential eher untypisch. In Versuchen mit SCCHN-Zellen konnte durch Panitumumab (10 µg/ml) nach einer Inkubationszeit von 18 h keine Tumorzelllyse und damit keine LDH-

Freisetzung beobachtet werden (LOPEZ-ALBAITERO & FERRIS, 2007). Auch die Initiierung der Apoptose konnte unter Zugabe von Panitumumab nicht festgestellt werden. In den SCCHN-Zellen konnte allerdings unter Einfluss von Panitumumab eine Antikörper-abhängige-Zellzytotoxizität anhand der LDH-Freisetzung beobachtet werden. Die beschriebenen Ergebnisse sind mit den eigenen Resultaten nur bedingt vergleichbar, da sowohl die Zelllinie als auch die Inkubationszeit mit Panitumumab variierte. Die HT-29-Zellen zeigten sich erneut weniger sensitiv gegenüber Panitumumab als die A549-Zellen.

Um sicher zu gehen, dass die ermittelte Zytotoxizität durch den spezifischen Angriff von Panitumumab hervorgerufen wurde und nicht durch unspezifische Begleiteffekte, wäre eine Kontrolle mit einem unbedeutenden IgG2-Antikörper in weiterführenden Versuchen sinnvoll. Der LDH-Test zeichnet sich durch eine große Sensitivität gegenüber Substanzen aus, die die Zellmembran direkt schädigen. Da Panitumumab die Integrität der Zellmembran vermutlich indirekt aufhebt, könnte mit einem weiteren Verfahren, das auf den Nachweis von ATP beruht, die Zytotoxizität des Antikörpers evtl. noch genauer bestimmt werden. (WEYERMANN *et al.*, 2005).

4.5 Koloniebildungstests

4.5.1 Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen unter Einfluss von Panitumumab

Sowohl im Ansatz mit einer Inkubationszeit von 14 Tagen, als auch im Ansatz mit 12 Tagen konnte ab einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy ein strahlensensibilisierender Effekt durch Panitumumab in den A549-Zellen beobachtet werden. Im Versuchsansatz mit der kürzeren Inkubationszeit von 12 Tagen war im Gegensatz zu 14 Inkubationstagen ein deutlicher zytotoxischer Effekt im ganzen Dosisbereich vorhanden, der sich durch kleinere Platiereffizienzen und demzufolge geringeren Überlebensraten auszeichnete. Unter der Betrachtung, dass in den letzten 2 Inkubationstagen besonders die Koloniegröße zunimmt, ist leicht zu erklären, weshalb bei hohen Bestrahlungsdosen im Versuchsansatz mit 12 Inkubationstagen weniger Kolonien gezählt wurden, da sie die Größe von 50 Zellen nicht erreichten. Die neuauftretende Differenz in der Anzahl der Kolonien zwischen der Kontrolle und dem Ansatz mit Panitumumab im Dosisbereich von 0 Gy bis 4 Gy lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Kolonien der Kontrolle durch die kürzere Inkubationszeit weniger

dicht lagen und ein besseres Auszählen ermöglichte. Für weitere Ansätze wäre bei den A549-Zellen eine Inkubationszeit von 12 Tagen zu empfehlen.

Diverse Zelllinien wurden in der Vergangenheit bereits auf ihre Koloniebildungsfähigkeit in Abhängigkeit einer Kombination aus Bestrahlung und der Interaktion mit dem EGFR-Signalweg untersucht. Bisher liegen jedoch noch keine spezifischen Ergebnisse zur kombinierten Wirkung von Bestrahlung und Panitumumab in den A549- und HT-29-Zellen vor. In dieser Arbeit konnte ein strahlensensibilisierende Effekt unter Einfluss von Panitumumab festgestellt werden, der in den eingesetzten Konzentrationen (50 nM und 100 nM) mit der Bestrahlungsdosis zunahm. Untersuchungen zur Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen unter Einfluss des monoklonalen chimären Antikörpers Cetuximab, der auf die gleiche Weise am EGF-Rezeptor wirkt, zeigten vergleichbare Ergebnisse (DITTMANN *et al.*, 2005). In den Versuchen von DITTMANN war ein noch stärkerer und gleichzeitig signifikanter strahlensensibilisierender Effekt durch den EGFR-Antagonisten vorhanden. Außerdem konnte eine Strahlensensibilität durch Panitumumab in der NSCLC-Zelllinie H226 beobachtet werden (KRUSER *et al.*, 2008). Eine erhöhte Strahlensensitivität wurde in den A549-Zellen zudem unter Beeinflussung des EGFR-Signalweges mittels Tyrosinkinaseinhibitoren wie z. B. Gefitinib erreicht (BURDAK-ROTHKAMM *et al.*, 2005; ZHUANG *et al.*, 2009).

Die erhöhte Radiosensibilität, hervorgerufen durch einen monoklonalen Antikörper am EGFR wie Panitumumab, wird zum einen darin begründet, dass die Zellen durch den Wirkstoff in die strahlensensiblere G₁-Phase des Zellzyklus versetzt werden, während der Anteil der Zellen in der strahlenresistenteren S-Phase-Fraktion gleichzeitig vermindert wird (HUANG & HARARI, 2000). Diese Begründung wird zusätzlich durch die Hypothese gestützt, dass die Wachstumsstimulation mittels EGF auf die Zellen radioprotektiv wirkt und die Wachstumsinhibition über den EGF-Rezeptor wie zum Beispiel unter Einfluss von Panitumumab zu einer Radiosensibilisierung führt (WOLLMANN *et al.*, 1994).

Zum anderen wird angenommen, dass Panitumumab die Reparaturkapazität der Zellen nach der Bestrahlung beeinträchtigt. Durch die Antagonisierung am EGFR wird dessen Translokation in den Zellkern unterbunden und die Aktivierung von Reparaturenzymen (DNA-Proteinkinasen) bleibt aus (BANDYOPADHYAY *et al.*, 1998). In Abhängigkeit von Cetuximab konnte beobachtet werden, dass im Vergleich zur Kontrolle die Aktivierung der DNA-Proteinkinasen etwa 10 min nach der Bestrahlung deutlich verringert war (DITTMANN *et al.*, 2005). Interessant ist, dass die EGFR-Translokation nicht in Abhängigkeit vom Agonisten und der Phosphorylierung des EGFR stattfindet, sondern durch DNA schädigende Mechanismen oder Substanzen wie z.B. Bestrahlung, Wasserstoffperoxid, Hitze (42°C) und Cisplatin ausgelöst wird.

Unter Einfluss von Cetuximab am EGFR konnte zusätzlich eine gesteigerte strahlungsinduzierte Apoptoserate beobachtet werden (HUANG *et al.*, 1999). Ob dies auch ein Grund für die verminderte Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen in Abhängigkeit von Panitumumab ist, kann nur vermutet werden.

Als ein weiterer Mechanismus, der die durch Panitumumab induzierte erhöhte Strahlensensibilität erklären könnte, wird die verminderte strahleninduzierte, ligandenunabhängige EGFR-Phosphorylierung diskutiert (KRUSER, 2008). Die ligandenunabhängige Phosphorylierung des EGFR durch ionisierende Bestrahlung und die daraus resultierende Aktivierung sämtlicher Signalwege wurde von SCHMIDT-ULLRICH *et al.* (2003) beschrieben.

Da in den A549-Zellen trotz *KRAS*-Mutation die Tendenz eines strahlensensibilisierenden Effekts durch Panitumumab gezeigt werden konnte, ist diese Mutation möglicherweise nicht der prognostische Faktor für dessen Wirkung. Als ein bedeutsamer Faktor für die durch einen monoklonalen Antikörper hervorgerufene Strahlensensibilität wird die absolute EGFR-Expression einer Tumorzelllinie diskutiert (AKASHI *et al.*, 2008), die in den A549-Zellen besonders hoch ist.

4.5.2 Koloniebildungsfähigkeit der HT-29-Zellen unter Einfluss von Panitumumab

In den Versuchen zur Koloniebildungsfähigkeit wurde deutlich, dass es sich bei den HT-29-Zellen um eine sehr strahlenresistente Zelllinie handelt, da es erst im hohen Dosisbereich (ab 6 Gy) zu einem starken Abfall der Überlebensfraktion kam. Zusätzlich konnte in früheren Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Strahlenresistenz in einem Zusammenhang mit einer nur minimalen Apoptoserate nach der Bestrahlung steht (DUNNE *et al.*, 2003).

Unter dem Einfluss von Panitumumab konnte in den HT-29-Zellen kein Effekt auf die Koloniebildungsfähigkeit beobachtet werden. Dies scheint im Zusammenhang mit den anderen Versuchen dieser Arbeit, in denen die Effekte durch Panitumumab auf die HT-29-Zellen wenn überhaupt auch eher gering ausfielen, nicht überraschend. Ob auch hier die *BRAF*-Mutation *V600E* in den HT-29-Zellen von Bedeutung ist, andere Mutationen eine Rolle spielen oder möglicherweise die niedrige EGFR-Expression ausschlaggebend für die fehlende Wirkung ist, kann in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Auch die Literatur gibt bisher keine Auskunft über den Zusammenhang von ionisierender Bestrahlung und der gleichzeitigen Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper in den HT-29-Zellen.

4.6 Bestimmung der γ -H2AX-Foci als Maß für die Reparaturkapazität von DNA-Doppelstrangbrüchen

In dieser Arbeit wurde die Immunhistochemie angewandt, um DNA-Doppelstrangbrüche unter Einfluss von Bestrahlung und Panitumumab mittels der γ -H2AX-Methode nachzuweisen. Die Phosphorylierung der Histonkomponente H2AX ist ein wichtiger Bestandteil der strahlungsinduzierten Reparatur und findet vor allem durch die Proteinkinase ATM (ataxia telangiectasia mutated), aber auch durch DNA-PKs und ATR (ataxia telangiectasia RAD3-related) statt (AN *et al.*, 2010). Die Dephosphorylierung des γ -H2AX im Reparaturprozess ist ein weiterer Regulationspunkt und erfolgt mittels der Phosphatasen PP2A und PP4C, über die jedoch erst wenig bekannt ist. Die Phosphorylierung des Histons H2AX zu γ -H2AX erreicht 30 min nach der Bestrahlung sein Maximum. Danach folgt eine kurze Plateauphase von ca. 1h bevor die Anzahl der γ -H2AX-Histonkomplexe wieder abnimmt (MAH *et al.*, 2010). Um die maximale Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche zu erfassen, erfolgte die Fixierung der Zellen 1 h nach der Bestrahlung. Die Reparatur hingegen ist spätestens nach 3 h weitestgehend abgeschlossen und sollte mit der Analyse der DNA-Doppelstrangbrüche nach 24 h untersucht werden.

Die Detektion der γ -H2AX-Foci zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen hat sich als besonders häufig angewandtes und sensitives Verfahren etabliert, da zwischen der Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche und den im Fluoreszenzmikroskop sichtbaren γ -H2AX Foci eine Korrelation von 1:1 besteht (SEDELNIKOVA *et al.*, 2002). Trotz dieses positiven Aspektes der Methode konnte beobachtet werden, dass das manuelle Auszählen der „Foci“ durch ihre dreidimensionale Anordnung im Zellkern erschwert wird und ein sehr genaues Arbeiten erfordert. Aufgrund dieser subjektiven Fehlerquellen wäre zur Bestätigung der Ergebnisse des γ -H2AX-Tests die Anwendung eines weiteren Verfahrens sinnvoll. Die pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), die auf Größenveränderung der DNA durch DNA-Doppelstrangbrüche basiert, stellt ein solches Verfahren dar. Allerdings sind für auswertbare Ergebnisse Bestrahlungsdosen von über 5 Gy erforderlich. Zusätzlich werden innerhalb des Verfahrens hohe Temperaturen benötigt, die ebenfalls DNA-Doppelstrangbrüche induzieren können (KINNER *et al.*, 2008). Ein weiteres Verfahren zum Nachweis strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche stellt der einfach durchführbare CometAssay dar. Der Test ist als fertiges Versuchskit erhältlich, wobei er wiederum weniger sensitiv als der γ -H2AX-Nachweis ist, da auch bei unbestrahlten Zellen deutliche Kometenstreifen auftreten.

Bisher wurde nicht abschließend geklärt, ob die γ -H2AX Formation durch genotoxische Noxen ultraviolette Strahlung, chemischen Agenzien oder oxidativen Stress hervorgerufen werden kann.

Hierbei soll die vergrößerte Anzahl an „Foci“ über die Manipulation der Phosphorylierungskaskade von H2AX hervorgerufen werden (KINNER *et al.*). Dies macht das Ansetzen von Kontrollen im Versuch unabdingbar.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse in 3.6.1 und 3.6.2 erscheint es zunächst unerwartet, dass sowohl in den A549-Zellen, als auch in den HT-29-Zellen durchschnittlich 5 bzw. 8 DNA-Doppelstrangbrüche gezählt worden sind, obwohl die Zellen weder der Bestrahlung noch Panitumumab ausgesetzt waren. Doch diese DNA-Doppelstrangbrüche werden als Auswirkungen physiologischer Prozesse (Rekombination), ATM-Autoaktivierung und der konstitutiven DNA-Schädigung durch die Tumormaschinerie beschrieben (BARTKOVA *et al.*, 2005). Des Weiteren wird die DNA-Schädigung in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen durch reaktive Sauerstoff-Radikale diskutiert, die durch die metabolische Aktivität der Zellen während des Zellzyklus entstehen (HUANG *et al.*, 2006).

Erwartungsgemäß stieg die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in Abhängigkeit der Bestrahlung bei einer Dosis von 6 Gy in den A549-Zellen und den HT-29-Zellen deutlich an (17 bzw. 16 DNA-Doppelstrangbrüche). Ausgehend von der Anzahl der Foci in den unbestrahlten Proben zeigten sich die HT-29-Zellen etwas strahlenresistenter im Vergleich zu den A549-Zellen. Dies bestätigte die Ergebnisse aus den Koloniebildungstests. In den A549-Zellen zeigte sich, dass durch die Einwirkung von Panitumumab die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche zunahm. Interessanterweise war dies sowohl in Kombination mit Bestrahlung als auch bei der alleinigen Zugabe von Panitumumab zu beobachten, aber nicht nach einer Reparaturzeit von 24 h. Vergleichend mit anderen Versuchen ist der strahlensensibilisierender Effekt (vermehrte Foci nach 1 h) nachvollziehbar. Im Gegensatz zu Versuchen mit Cetuximab in A549-Zellen (DITTMANN *et al.*, 2005) und in Versuchen mit Panitumumab in SCCHN-Zellen (KRUSER *et al.*, 2008), entspricht der fehlende Effekt durch Panitumumab in den A549-Zellen nach 24 h Reparaturzeit nicht den Erwartungen. Gerade die durch einen EGFR-Antagonisten verminderte Reparaturkapazität, hervorgerufen durch die verringerte EGFR-Translokation und die damit verbundene Senkung der DNA-Proteinkinase-Aktivität, wurde im großen Rahmen untersucht und als einer der Hauptursachen für die Strahlensensibilität diskutiert. Im Rahmen des Versuchsansatzes fällt auf, dass in den beschriebenen Versuchen von KRUSER und DITTMANN Panitumumab 1 h vor Bestrahlung hinzugegeben wurde, während es in den Versuchen dieser Arbeit über 48 h mit den Zellen inkubiert wurde. Möglicherweise ist das die Ursache, weshalb die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit von denen der Literatur abweichen, oder die Kombination aus Panitumumab und Bestrahlung ist speziell für die A549-Zellen nicht mit den anderen Konstellationen der Literatur vergleichbar. In dieser Hinsicht wäre es durchaus

interessant, den genauen Mechanismus für die durch Panitumumab induzierte Strahlensensibilität zu ermitteln. Mittels SDS-Page- und Western Blott-Analysen könnte z. B. die Menge an phosphoryliertem EGF-Rezeptor, die EGFR-Translokation und das Vorkommen von DNA-Proteinkinasen und ATM nachgewiesen werden.

In Versuchen mit Gefitinib, einen Tyrosinkinaseinhibitor, der die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors hemmt, wurde bei dessen Anwesenheit ebenfalls eine erhöhte Radiosensitivität in den A549-Zellen beobachtet. Die beschriebenen Verfahren konnten aber auch hier nicht zu der Aufklärung des genauen Mechanismus der verlängerten Präsenz der DNA-Doppelstrangbrüche verhelfen (TANAKA *et al.*, 2008).

Interessanterweise konnte in anderen Versuchen in Abhängigkeit eines weiteren Tyrosinkinaseinhibitors nur in den A549-Zellen, als Beispiel für eine *KRAS*-Mutante, eine verminderte Reparaturkapazität und eine größere Anzahl an γ -H2AX-Foci beobachtet werden, nicht jedoch im *KRAS*-Wildtyp (TOULANY *et al.*, 2006).

Zur richtigen Beurteilung des Einflusses von Panitumumab auf die Reparaturkapazität der A549-Zellen sind weitere Untersuchungen erforderlich. In Anlehnung an die anderen Methoden zeigte auch der γ -H2AX-Test, dass der *KRAS*-Status nicht entscheidend für das Ansprechen auf Panitumumab ist.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die beiden Tumorzelllinien A549 und HT-29 in ihrem Ansprechen auf Panitumumab zu untersuchen. Dazu wurden mehrere *In-vitro*-Methoden angewandt, die die Eigenschaften und das Wirkspektrum dieses monoklonalen Antikörpers genauer charakterisieren sollten. Die kombinierte Behandlung der Zellen mit Panitumumab und ionisierender Strahlung diente zur Detektion therapierelevanter additiver oder gar supraadditiver Effekte. Der Unterschied im *KRAS*-Status und ein damit verbundenes, unterschiedliches Ansprechen der Zelllinie auf Panitumumab war ein weiteres Beobachtungstarget.

Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

- Das Wachstum der A549-Zellen (*KRAS*-Mutation) wurde unter Einfluss von Panitumumab signifikant gehemmt. Dabei zeigten die Wachstumskurven einen konzentrationsunabhängigen Verlauf. Die eingeschränkte Proliferationsfähigkeit in Anwesenheit von Panitumumab konnte mittels BrdU-Test bestätigt werden. Zudem hatte der Antikörper ein diskret zytotoxisches Potential auf die A549-Zellen (LDH-Test).
- Durch die kombinierte Behandlung der A549-Zellen mit Panitumumab und ionisierender Strahlung zeigte sich die Tendenz eines strahlensensibilisierenden Effekts, der anhand einer verminderten Koloniebildungsfähigkeit nachgewiesen werden konnte. Kombinierte Effekte spiegelten sich zudem in einer erhöhten Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen wider, wobei die Reparaturkapazität unbeeinflusst blieb.
- Panitumumab beeinflusste die HT-29-Zellen (*KRAS*-Wildtyp) weder in ihrem Wachstum, ihrer metabolischen Aktivität, noch in ihrer Strahlensensibilität.
- Die erhaltenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der *KRAS*-Status im Fall der untersuchten Zellen nicht als prädiktiver Faktor auf das Ansprechen auf Panitumumab genutzt werden kann.

Das unabhängige oder gar gegensätzliche Ansprechen der Zellen auf die Behandlung mit Panitumumab in Abhängigkeit von ihrem *KRAS*-Status war sehr überraschend. Dies steht weder mit den klinischen Studien, noch mit der darauf beruhenden europäischen Zulassung in Einklang. Gleichzeitig zeigte Panitumumab ein Potential, das auch zur Behandlung von Tumoren mit einer *KRAS*-Mutation befähigen könnte. Damit wird deutlich, dass der Effekt von Panitumumab nicht nur von einem prädiktiven Faktor allein abhängig ist. Der EGFR und dessen Signalwege regulieren über ein komplexes System die Proliferation und den Metabolismus der

Zellen, in denen eine Vielzahl von Mutationen das Therapieansprechen auf einen EGFR-Antagonisten beeinflussen kann. Abgesehen von der Tatsache, dass längst nicht alle Signalwege im Detail erforscht sind, müsste ein ganzer Genstatus individualspezifisch erhoben werden, um die Effektivität einer Antikörper-Therapie am EGFR vorauszusagen.

Die kombinierte Wirkung von Panitumumab und ionisierender Strahlung gestaltete sich als aussichtsreich und rechtfertigt den Einsatz des Antikörpers zusammen mit der Radiotherapie in klinischen Studien. Da Panitumumab in verschiedenen *In-vitro*-Untersuchungen besonders auf Tumorzellen des NSCLC (z. B. A549) und SCCHN strahlensensibilisierend wirkte, erscheint die kombinierte klinische Anwendung bei diesen Neoplasien sinnvoll.

Literaturverzeichnis

AKASHI Y, OKAMOTO I, IWASA T, YOSHIDA T, SUZUKI M, HATASHITA E, YAMADA Y, SATOH T, FUKUOKA M, ONO K, NAKAGAWA K. (2008) Enhancement of the antitumor activity of ionising radiation by nimotuzumab, a humanised monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor, in non-small cell lung cancer cell lines of differing epidermal growth factor receptor status. *Br J Cancer*. 98(4): 749-755.

ALBERTS B. Zellteilung in: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie BRAY D, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. WILEY-VCH Verlag GmbH Weinheim (1999) 587-591.

AMADO RG, WOLF M, PEETERS M, VAN CUSTEM E, SIENA S, FREEMAN DJ, JUAN T, SIKORSKI R, SUGGS S, RADINSKY R, PATTERSON SD, CHANG DD. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 26(10): 1626-1634.

AN J, HUANG YC, XU XZ, ZHOU LJ, SHANG ZF, HUANG B, WANG Y, LIU XD, WU DC, ZHOU PK. (2010) DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Mol Biol*. 11(18): 1-13.

BANDYOPADHYAY D, MANDAL M, ADAM L, MENDELSON J, KUMAR R. (1998) Physical Interaction between Epidermal Growth Factor Receptor and DNA-dependent Protein Kinase in Mammalian Cells. *J Biol Chem*. 273(3): 1568-1573.

BARDELLI A AND SIENA S. (2010) Molecular Mechanisms of Resistance to Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 28(7):1254-1261.

BARTKOVA J, BAKKENIST CJ, RAJPERT-DE MYETS E, SKAKKEBAEK NE, LUKAS J, SEHESTED M, KASTAN MB, BARTEK J. (2005) ATM Activation in Normal Human Tissues and Testicular Cancer. *Cell Cycle* 4(6): 838-845.

BASELGA J. (2002) Why Epidermal Growth Factor Receptor? The Rationale for Cancer Therapy. *Oncologist* 7 Suppl 4: 2-8.

BAUMGART T. (2008) In-vitro-Untersuchungen zur Ermittlung der kombinierten Wirkung des Chemotherapeutikums Etoposid B und ionisierender Strahlung auf Tumorzellen. Diplomarbeit der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie der Universität Rostock.

BIANCHINI D, JAYANTH A, CHUA YJ, CUNNINGHAM D. (2008) Epidermal Growth Factor Inhibitor-Related Skin Toxicity: Mechanisms, Treatment and its Potential Role as a Predictive Marker. *Clin Colorectal Can* 7(1): 33-43.

BURDAK-ROTHKAMM S, RÜBE CE, NGUYEN TP, LUDWIG D, FELDMANN K, WIEGEL T, RÜBE C. (2005) Radiosensitivity of Tumor Cell lines after Pretreatment with the EGFR Tyrosin Kinase Inhibitor ZD1839 (Iressa®). *Strahlenther Onkol*. 181(3): 197-204.

CARTENI G, FIORENTINO R, VECCHIONE L, CHIURAZZI B, BATTISTA C. (2007) Panitumumab a novel drug in cancer treatment. *Ann Oncol*.18 Suppl 6:vi16-21.

CHUA W, KHO PS, MOORE MM, CHARLES KA, CLARKE SJ. (2010) Clinical, laboratory and molecular factors predicting chemotherapy efficacy and toxicity in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, doi:10.1016/j.critrevonc.2010.07.012

CHUA YJ AND CUNNINGHAM D. (2006) Panitumumab. *Drugs of Today* (11): 711-719.

COHENURAM M AND SAIF MW. (2007) Panitumumab the first fully human monoclonal antibody: from the bench to the clinic. *Anti-Cancer Drugs* 18(1): 7-15.

COLE SP. (1986) Rapid Chemosensitivity testing of human lung tumor cells using MTT assay. *Cancer Chemother Pharmacol*. 17(3): 259-263.

DI LEONARDO A, LINKE SP, CLARKIN K, WAHL GM. (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G₁ arrest and long-term induction of Cip 1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev*. 8(21): 2540-2551.

DI NICOLANTONIO F, MARTINI M, MOLINARI F, SARTORE-BIANCHI A, ARENA S, SALETTI P, DE DOSSO S, MAZZUCHELLI L, FRATTINI M, SIENA S, BARDELLI A.(2008) Wild-Type BRAF Is Required for Response to Panitumumab or Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 26(35): 5705-5712.

DIETEL M, TANNAPFEL A, BARETTON G, KREIPE H, KLOOR M, GRABBERT H, KIRCHNER T. (2008) Molekularpathologische KRAS-Mutationsanalyse. *Chirurg* (79): 576-579.

DITTMANN K, MAYER C, FEHRENBACHER B, SCHALLER M, RAJU U, MILAS L, CHEN DJ, KEHLBACH R, RODEMANN HP. (2005) Radiation-induced Epidermal Growth Factor Receptor Nuclear Import Is Linked to Activation of DNA-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem*. 280(35): 31182-31189.

DITTMANN K, MAYER C, RODEMANN HP. (2005) Inhibition of radiation-induced EGF nuclear import by C225 (Cetuximab) suppresses DNA-PK activity. *Radiother Oncol*. 76(2): 157-161

DUNNE AL, PRICE ME, MOTHERSILL C, MCKEOWN SR, ROBSON T ,HIRST DG. (2003) Relationship between clonogenic radiosensitivity, radiationinduced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells. *Br J Cancer* 89(12): 2277-2283.

DUTTA PR AND MAITY A. (2007) Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett*. 245(2): 165-177.

FAKIH MM. (2010) *KRAS* Mutation Screening in Colorectal Cancer: from Paper to Practice. *Clin Colorectal Cancer* 9(1): 22-30.

FRIDAY BB AND ADJEI AA. (2005) K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*. 1756(2): 127-144.

GARCIA-SAENZ JA, SASTRE J, DIAZ-RUBIO GE. (2009) Biomarkers and anti-EGFR therapies for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Clin Transl Oncol.* (11): 737-47.

GERBER DE. (2008) EGFR Inhibition in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Drug Dev Res.* 69(6): 359-372.

GIANNOPOULOU E, ANTONACOPOULOU A, PANAGIOTA M, HARALABOS PK. (2009) Autophagy: Novel Action of Panitumumab in Colon Cancer. *Anticancer Research* 29: 5077-5082

GRIDELLI C, MAIONE P, FERRARA ML, ANTONIO R. (2009) Cetuximab and Other Anti-Epidermal growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies in the Treatment of Non-Small Cell lung. Cancer. *Oncologist* 14(6): 601-611.

HALL EJ. Radiosensitivity and Cell Age in the Mitotic Cycle in: *Radiobiology for the Radiologist*. 4th Edition J. B. Lippincott Company, Philadelphia (1994) 91-105.

HALL EJ. The Physics and Chemistry of Radiation Absorption in: *Radiobiology for the Radiologist*. 4th Edition J. B. Lippincott Company, Philadelphia (1994) 1-13.

HARTMUT JUHL. Chirurgische Onkologie in: *Duale Reihe Chirurgie* HENNE-BRUNS D, DÜRIG M, KREMER B. 2. Auflage Georg Thieme Verlag Stuttgart (2003) 235-257.

HERBST R S AND SHIN DM. (2001) Monoclonal Antibodies to Target Epidermal Growth Factor Receptor-Positive Tumors. *Cancer* 94(5): 1593-1611.

HEROLD G (2008) *Innere Medizin*, 371-77; 462-67.

HUANG SM AND HARARI P. (2000) Modulation of Radiation Response after Epidermal Growth Factor Receptor Blockade in Squamous Cell Carcinomas: Inhibition of Damage Repair, Cell Cycle Kinetics, and Tumor Angiogenesis. *Clin Cancer Res.* (6): 2166-2174.

HUANG SM, BOCK JM, HARARI P. (1999) Epidermal Growth Receptor blockade with C225 Modulates Proliferation, Apoptosis, and Radiosensitivity in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. *Cancer Res.* 59(8): 1935-1940.

HUANG X, TANAKA T, KUROSE A, TRAGANOS F, DARZYNKIEWICZ Z. (2006) Constitutive histone H2AX phosphorylation on Ser-139 in cells untreated by genotoxic agents in cell-cycle phase specific and attenuated by scavenging reactive oxygen species. *Int. J. Oncol.* 29(2): 495-501.

JANMAAT ML AND GIACCONE G. (2003) The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway and its Inhibition As Anticancer Therapy. *Drugs of Today* 39 (Suppl. C): 61-80.

JANMAAT ML, KRUYT FA, RODRIGUEZ JA, GIACCONE G. (2003) Response to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer Cells: Limited Antiproliferative Effects and Absence of Apoptosis Associated with Persistent Activity of Extracellular Signal-regulated Kinase or Akt Kinase Pathways. *Clin Cancer Res.* 9(6): 2316-2326.

JIMENO A, MESSERSMITH WA, HIRSCH FR, FRANKLIN WA, ECKHARDT SG. (2009) KRAS mutations and susceptibility to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *Cancer J.* 15(2): 110-113.

KINNER A, WU W, STAUDT C, ILIAKIS G. (2008) γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 36(17): 5678-5694.

KRUSER TJ, ARMSTRONG EA, GHIA J, HUANG S, WHEELER DL, RADINSKY R, FREEMAN DJ, HARARI M. (2008) Augmentation of radiation response by panitumumab in models of upper aerodigestive tract cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 72(2): 534-542.

LOPEZ-ALBEITERO A, FERRIS RL. (2007) Immune Activation by Epidermal Growth Factor Receptor-Specific Monoklonal Antibody Therapy for Head and Neck Cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 133(12): 1277-1281.

MAH LJ, EL-OSTA A, KARAGIANNIS TC. (2010) γ -H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24(4): 679-686.

PATRILAS CA AND SOLIT D. (2007) Therapeutic Strategies for Targeting BRAF in Human Cancer. *Rev Recent Clin Trials* 2(2): 121-134.

PETRIDES PE. Tumorgewebe in: Pathochemie & Pathobiochemie. LÖFFLER G, HEINRICH PC. 8. Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg (2008) 1142-1149.

ROBERT KOCH-INSTITUT (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe, (2010).

SAUER R. Allgemeine Onkologie in: Strahlentherapie und Onkologie. 5. Auflage Elsevier GmbH, München (2010) 21-77.

SCHMIDT-ULLRICH RK, CONTESSA JN, LAMMERING G, AMORINO G, LIN PS. (2003) ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses. *Oncogene* 1;22(37): 5855-5865.

SEDELNIKOVA OA, ROGAKOU EP, PANYUTIN IG, BONNER WM. (2002) Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res.* 158(4): 486-492.

TANAKA T, MUNSHI A, BROOKS C, LIU J, HOBBS ML, MEYN RE. (2008) Gefitinib Radiosensitizes Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Suppressing Cellular DNA Repair Capacity. *Clin Cancer Res.* 14(4): 1266-1273.

TOULANY M, KASTEN-PISULA U, BRAMMER I, WANG S, CHEN J, DITMANN K, BAUMANN M, DIKOMEY E, RODEMANN HP. (2006) Blockage of Epidermal Growth Factor Receptor-Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Signaling increases Radiosensitivity of K-Ras Mutated Human Tumor Cells *in vitro* by Affecting DNA Repair. *Clin Cancer Res.* 12(13): 4119-4126.

VAN CUSTEM E, PEETERS M, SIENA S, HUMBLET Y, HENDLISZ A, NEYNS B, CANON JL, VAN LAETHEM JL, MAUREL J, RICHARDSON G, WOLF M, AMADO RG. (2007) Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 25(13): 1658-1664.

WEYERMANN J, LOCHMANN D, ZIMMER A. (2005) A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm.* 288(2):369-376.

WILHELM SM, CARTER C, TANG LY, WILKIE D, McNABOLA A, RONG H, CHEN C, ZHANG X, VINCENT P, MC HUGH M, CAO Y, SHUJATH J, GAWLAK S, EVELEIGH D, ROWLEY B, LIU L, ADNANE L, LYNCH M, AUCLAIR D, TAYLOR I, GEDRICH R, VOZNESENKY A, RIEDEL B, POST LE, BOLLAG G, TRAIL PA. (2004) BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis. *Cancer Res.* 64(19): 7099-7109.

WOLLMANN R, YAHALOM J, MAXY R, PINTO J, FUKS Z. (1994) Effect of epidermal growth factor on the growth and radiation sensitivity of human breast cancer cells *in vitro*. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 30(1): 91-98.

YAN L, HSU K, BECKMAN RA. (2008) Antibody-Based Therapy for Solid Tumors. *Cancer J.* 14(3): 178-183.

ZHUANG HQ, SUN J, YUAN ZY, WANG J, ZHAO LJ, WANG P, REN XB, WANG CL. (2009) Radiosensitizing effects of gefitinib at different administration times *in vitro*. *Cancer Sci.* 100(8): 1520-1525.

Thesen

Bisher ist Panitumumab in der Monotherapie zur Behandlung des metastasierten Kolorektalen Karzinoms zugelassen. Aufgrund der geringen toxischen Wirkungen und möglicher strahlensensibilisierender Effekte erscheint eine kombinierte Anwendung von Panitumumab und ionisierender Strahlung als viel versprechend.

Mittels vorklinischer *In-vitro*-Studien wurde die kombinierte Wirkung von Panitumumab und ionisierender Bestrahlung auf die beiden humanen Tumorzelllinien HT-29 und A549 untersucht.

Verschiedene *In-vitro*-Methoden wurden angewandt, um das Wirkspektrum dieses ersten voll humanisierten Antikörpers auf die beiden Tumorzelllinien genauer zu charakterisieren.

Ein besonderes Augenmerk galt dem Vergleich der Wirkung des Antikörpers auf Zellen mit unterschiedlichem *KRAS*-Status (HT-29: *KRAS*-Wildtyp, A549: *KRAS*-Mutation), der laut klinischen Studien entscheidend für das Ansprechen auf Panitumumab ist.

Das Wachstum der A549-Zellen (*KRAS*-Mutation) wurde unter Einfluss von Panitumumab unabhängig von dessen Konzentration signifikant gehemmt. Die eingeschränkte Proliferationsfähigkeit in Anwesenheit des Antikörpers konnte mittels BrdU-Test bestätigt werden. Panitumumab besaß zudem ein diskret zytotoxisches Potential auf die A549-Zellen (LDH-Test).

Durch die kombinierte Behandlung der A549-Zellen mit Panitumumab und ionisierender Strahlung zeigte sich die Tendenz eines strahlensensibilisierenden Effektes, der anhand einer verminderten Koloniebildungsfähigkeit nachgewiesen werden konnte.

Panitumumab beeinflusste die HT-29-Zellen (*KRAS*-Wildtyp) weder in ihrem Wachstum, ihrer metabolischen Aktivität, noch in ihrer Strahlensensibilität.

Die erhaltenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der *KRAS*-Status im Fall der untersuchten Zellen nicht als prädiktiver Faktor auf das Ansprechen auf Panitumumab genutzt werden kann.

Die kategorische Ablehnung des Einsatzes von Panitumumab in Tumoren mit einer *KRAS*-Mutation scheint daher als ungerechtfertigt und könnte den Zugang zu möglichen Therapieoptionen verhindern.

Die kombinierte Anwendung zeigte sich als aussichtsreich und kann für klinische Studien empfohlen werden. Da der Antikörper in den *In-vitro*-Untersuchungen auf Tumorzellen des NSCLC (z. B. A549) strahlensensibilisierend wirkte, erscheint der gemeinsame klinische Einsatz bei diesen Neoplasien als sinnvoll.